



**Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine**



Zborník vedeckých prác JLF UK 2024

Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Zborník vedeckých prác JLF UK 2024

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou. Za obsahovú, ako aj gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov. Všetky práva vyhradené. Žiadna časť zborníka nemôže byť reprodukováaná bez súhlasu vydavateľa.

Editor: prof. MUDr. Dušan Meško, PhD., Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine

Recenzenti: prof. MUDr. Štefan Sivák, PhD., Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine
prof. RNDr. Ivan Varga, PhD. et PhD., Lekárska fakulta UK v Bratislave

Grafická úprava zborníka: Mgr. Ivana Švrková

Obálka zborníka: Milan Šulov

Vydavateľ: Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

ISBN 978 – 80 – 8187 – 166 - 5

EAN 9788081871665

Martin, 2024

Obsah:

Adiponektín ako uremický solút u dialyzovaných pacientov	4
Analýza lymfatickej mikrocirkulácie v psoriatických léziách	12
Antidotum inhibítora faktora Xa pri gynekologickom krvácaní ohrozujúcom život	19
Detekcia RNA a DNA vírusov v odpadových vodách – preliminárna štúdia	24
Efekt veku a ischemického poškodenia na biomolekuly	32
Fajčenie a funkcia endotelu v mladom veku	41
Incidentálny nález sklerotizujúceho pneumocytómu	50
Intraductálna oncocytárna papilárna neoplázia ampuly Vaterskej papily	56
Karboxypeptidáza B1 u dialyzovaných a nedialyzovaných pacientov vo vzťahu	60
Keratosis actinica – najčastejšia prekanceromatóza kože	65
Komunikácia s osobami so sluchovým postihnutím v systéme zdravotnej starostlivosti – výzvy a príležitosti pre vzdelávanie	75
Konštrukcia plazmidov kódujúcich fluorescenčne označené	85
Leptín ako uremický solút u dialyzovaných pacientov	94
Malígný melanotický tumor z obalov periférnych nervov	102
Morfometrické hodnotenie lymfatických ciev v zdravej koži	107
Nehojaci sa ulkus predkolenia, zaujímavý problém etiopatogenézy	115
Optimalizácia ddPCR analýzy na detekciu metylácie v promótorovej oblasti génu CDH13	124
Pozitívne a negatívne aspekty mentorstva študentov ošetrovateľstva	133
Primárny nodálny „double hit“ difúzny veľkobunkový	147
Riziko karcinómu hrubého čreva vo vzťahu k SNP CYP2W1 a	160
Rozsiahle poškodenie pečene parazitom Echinococcus granularis riešené chirurgicky	166
Úroveň vedomostí rodičov o pohybovom vývine dieťaťa do jedného roka	172
Vplyv fajčenia na citlivosť kašľového reflexu	181
Výskyt a morfológické charakteristiky tuberculum Zuckerkandli štítnej žľazy:	189
Význam genetického testovania v diagnostike von Willebrandovej choroby – kazuistiky	201
Zmeny mikrocirkulácie v psoriatických léziách	210

Adiponektín ako uremický solút u dialyzovaných pacientov (pôvodná práca)

Hudecová S¹., Stančík M.¹

¹I. Interná klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Chronická choroba obličiek je celosvetovo jedným z najpálčivejších medicínskych problémov súčasnosti. V posledných dvoch desaťročiach sa vedecké tímy z celého sveta venovali problematike adipocytokínovej regulácie v podmienkach chronickej hemodialýzy. V tejto štúdii analyzujeme adiponektín vo vzťahu k chronickej dialyzačnej liečbe a jej základným parametrom. Primárnym cieľom bolo overiť zaradenie adiponektínu medzi uremické solúty a objasniť vplyv parametrov adekvátnosti dialýzy na jeho koncentrácie. Sekundárnym cieľom bolo objasnenie vzťahu glomerulovej filtrácie s hladinou adiponektínu. Táto štúdia bola realizovaná na 82 pacientoch rozdelených na kontroly tvorené 50 nedialyzovanými pacientami prijatými za účelom realizovania koronarografického vyšetrenia a 32 dialyzovanými pacientami v cieľovej podskupine. Koncentrácie adiponektínu v cieľovej podskupine boli signifikantne vyššie ($7,63 \pm 5,59$ vs. $44 \pm 20,9$ ug/mL; $t = -15,14$; $p < 0,001$). Regresná analýza získaných dát potvrdila inverznú asociáciu adiponektinémie s hodnotou Kt/V. Regresná analýza získaných dát potvrdila tak inverznú asociáciu adiponektinémie s hodnotou Kt/V, ako aj glomerulovej filtrácie s adiponektinémiou.

Kľúčové slová: Adiponektín; Dialýza; Uremický solút; Uremický toxín.

Úvod

Adiponektín je proteohormón syntetizovaný nielen adipocytmi tukového tkaniva, ale aj inými bunkami, vrátane osteoblastov, buniek pečeneňového parenchýmu, myocytov, epitelových buniek a v gravidite placentárnym tkanivom (1). Adiponektín je inzulínový senzitizer a protizápalový, antiaterogénny adipokín, ktorý interaguje s dvoma povrchovo membránovými typmi receptorov: AdipoR1 a AdipoR2 prostredníctvom týchto receptorov pôsobí cez viaceré metabolické dráhy. AdipoR1 sa vyskytuje najmä v kostrových svaloch. V hepatocytoch je prítomný hlavne receptor AdipoR2. V obličkách dochádza k exprimovaniu oboch týchto receptorov (2). V myšacích modeloch adiponektín preukazuje renoprotektívny efekt na obličky a chráni ich pred rozvojom albuminúrie. Takisto sa preukázal antioxidačný účinok na obličky prostredníctvom aktivácie

signálnych dráh súvisiacich s AMPK (AMP- activated proteinkinase), čo zdôrazňuje antiinflamačný efekt na obličkové tkanivo (3). Tsioufis a kol. v tejto štúdii zistili, že mikroalbuminúria bola spojená s nižšími hladinami adiponektínu u nediabetických hypertonikov. Paradoxne sa hyperadiponektinémia pozorovaná u pacientov v chronickom dialyzačnom programe spája so zvýšenou mortalitou týchto pacientov, pretože odráža proteínovú malnutríciu a tiež nižšiu reziduálnu funkciu obličiek (4).

Súbor pacientov a metódy

Štúdia je exploratívna s transverzálnym dizajnom. Dovedna 82 subjektov bolo zaradených do cieľového ramena tvoreného 32 dialyzovanými pacientami a do kontrolného ramena tvoreného celkovo 50 nedialyzovanými kontrolami indikovanými na invazívne koronarografické vyšetrenie. V skupine kontrol boli zahrnutí aj pacienti so známou CKD G1 – G3b, bez akútneho poškodenia obličiek. U každého pacienta v cieľovom ramene sa tesne pred realizáciou dialýzy odobrali vzorky krvi v rámci pravidelných mesačných laboratórnych kontrol. Z týchto vzoriek krvi boli pomocou ELISA kitov stanovené ranné koncentrácie adiponektínu pomocou ELISA kit-u DRG EIA-4574. U každého pacienta v cieľovom ramene sme zistili hodnotu Kt/V pomocou automatizovaného systému merania založeného na ureovej kinetike prostredníctvom systému integrovaného v dialyzačnom monitore a vypočítali sme výšku ultrafiltrácie za jeden týždňový dialyzačný cyklus, na konci ktorého sme realizovali odber krvi na stanovenie koncentrácie adiponektínu. Suchú hmotnosť sme u každého dialyzovaného pacienta objektivizovali na princípe impedančného merania telesnej kompozície, pričom meranie nebolo ani v jednom prípade staršie ako 3 mesiace.

U každého pacienta v kontrolnom ramene bola v deň koronarografického vyšetrenia ráno po prebudení sa odobratá vzorka krvi, z ktorej sme koncentrácie adiponektínu stanovovali pomocou identických ELISA testov, ako v prípade cieľovej podskupiny. Všetky vzorky krvi boli okamžite po odobratí centrifugované za účelom separácie plazmy. Vzorky plazmy boli následne hlboko zmrazené. K rozmrazeniu vzoriek došlo bezprostredne pred ich spracovaním presným postupom stanoveným v manuáloch predmetných ELISA kitov. U subjektov v kontrolnom ramene sme merali hodnotu kreatinínu a pomocou rovnice MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) sme vypočítali hodnotu klírensu kreatinínu.

Analýzy výsledkov sme realizovali s pomocou IBM SPSS Statistics v. 25.0. Všetky skúmané kontinuálne premenné sme testovali na prítomnosť normálnej distribúcie za použitia Shapiro-Wilkovho testu a vizuálnej inšpekcie kvantilových diagramov. K problematike normalizácie sme pristupovali v zmysle platnosti centrálnej limitnej vety konzervatívne, to znamená iba v prípade nevyhnutnosti. Normalizácia premenných bola realizovaná prostredníctvom transformácie umocnením a transformácie prirodzeným logaritmom. Pri výpočte štatistickej významnosti diferencii

priemerných hodnôt meraných kontinuálnych premenných t-testom sme prostredníctvom Levenovho testu zisťovali nehomogenitu variancií. V prípade narušenia predpokladu homogenity variancií sme na kompenzáciu pri meraní štatistickej významnosti rozdielov priemerov použili Welchovu mutáciu t - testu. V prípade porovnávania binomiálnych premenných použitý bol chí - kvadrátový test.

Vplyv kontinuálnych a nominálnych nezávislých premenných na binomiálnu závislú premennú sme analyzovali prostredníctvom binomiálnej logistickej regresie. Predpoklad linearity sme testovali pomocou Box-Tidwellovej procedúry s následnou Bonferroniho adjustáciou alfa úrovni. Vhodnosť modelu bola posúdená pomocou Hosmerovho - Lemeshowho testu.

Súvislosť medzi kontinuálnou dependentnou premennou a kontinuálnymi a binomiálnymi prediktormi sme zisťovali pomocou postupného mnohopočetného lineárneho regresného modelovania s doprednou selekciou premenných. Autokoreláciu sme detekovali Durbinovým-Watsonovým testom. Linearitu v modeli sme overovali observáciou rozptylového diagramu studentizovaných rezíduí voči neštandardizovaným predikovaným hodnotám pre celý test ad hoc a aj osobitne observáciou rozptylových diagramov jednotlivých kontinuálnych premenných voči dependentnej premennej. Podmienku homoskedastickosti sme overovali observáciou identického rozptylového diagramu studentizovaných rezíduí voči neštandardizovaným predikovaným hodnotám, ako v prípade overovania predpokladu linearity. V prípade porušenia podmienky homoskedastickosti sme postupovali metódou váženej regresie najmenších štvorcov (weighted least square regression_{ang.}). Kolinearitu sme testovali výpočtom faktora inflácie variance. Neobvyklé body sme vylúčili výpočtom Cookovej vzdialenosti a pákového koeficientu. Pri konštrukcii lineárnych regresných modelov sme použili techniku doprednej eliminácie neefektívnych prediktorov. Vzhľadom na relatívne malý počet prípadov a na celkový cieľ realizácie regresných modelov (detekcia asociácie a jej smer a nie hľadanie zástupných parametrov predikcie dependnetných premenných) sme vo výsledkoch regresných analýz neuvádzali presné hodnoty B koeficientov, ale ich 95 % konfidenčné intervaly.

Výsledky

Pomocou Welchovho t-testu sme zistili, že hladiny adiponektínu u dialyzovaných pacientov boli štatisticky významne vyššie pri porovnaní s hladinami adiponektínu v kontrolnej podskupine ($7,63 \pm 5,59$ vs. $44 \pm 20,9$ ug/mL; $t = -15,14$; $p < 0,001$). Deskriptívne štatistický opis základných skúmaných charakteristík cieľovej a kontrolnej podskupiny a p-hodnoty príslušných štatistických testov sú v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Premenná	Kontrolná skupina	Cieľová skupina	Hladina významnosti (Studentov/Welchov t- test; Chí kvadrátový test)
Pohlavie	Muži: 13 Ženy: 37	Muži: 20 Ženy: 12	p < 0,001
Diabetes mellitus	Áno: 10 Nie: 40	Áno: 15 Nie: 17	p < 0,001
Vek	60,8 ± 8,1	63,4 ± 12,4	p = 0,309
Adiponektín (ug/mL)	7,63 ± 5,59	44,00 ± 20,90	p < 0,001
eGFR (mL/min/1,73m ²)	76,00 ± 18,07	-	-
Kt/V	-	1,475 ± 0,316	-
Ultrafiltrácia/týždeň (L)	-	8,31 ± 4,89	-

V ďalšom kroku sme pomocou binomiálnej logistickej regresie overili nález signifikantne zvýšenej hladiny adiponektínu u dialyzovaných pacientov. Dizajnovali sme model, ktorý analyzuje vplyv adiponektínu na dependentnú premennú Podskupina, ktorá odrážala zaradenie pacienta buď do cieľovej, alebo do kontrolnej podskupiny. Model bol doplnený o premenné Diabetes mellitus, Vek a Pohlavie. V rámci Box-Tidwellovej procedúry sme v prvom slede skonštruovali model zahŕňajúci interakčné atribúty medzi kontinuálnymi premennými a ich prirodzeným logaritmom. Bonferroniho korekcia alfa úrovni aplikovaná na všetky modelové atribúty znížila hranicu štatistickej významnosti na hodnotu $p < 0,0055$. V našom súbore sa nevyskytoval ani jeden odľahlý prípad definovaný hodnotou štandardizovaného rezídua ≥ 2 . Výsledok Hosmerovho - Lemeshowho testu ($p = 0,871$) preukázal, že nami postavený model je po matematickej stránke vhodne koncipovaný. Model bol štatisticky signifikantný ($\chi^2(5) = 91,27$; $p < 0,001$). Logistický regresný model správne klasifikoval 93,9 % testovaných subjektov. Pozitívna prediktívna hodnota bola 90,9 % a negatívna prediktívna hodnota dosiahla 95,9 %. Jediným štatisticky významným kontribútorom v modeli bola premenná Adiponektín. Súhrnná štatistika modelu s jeho jednotlivými kontribútormi je v tabuľke 2.

Tabuľka 2
Premenné v logistickej regresii

Wald			Sig.	Exp(B)	95 % konfidenčný interval pre EXP(B)	
					Spodný	Horný
Krok 1 ^a	Vek	,165	,685	,981	,893	1,077
	Adiponektín	11,678	,001	1,418	1,161	1,733
	Diabetes mellitus (Nie)	,009	,925	,876	,055	13,971
	Pohlavie (Muži)	,065	,798	1,460	,081	26,449
	Konštanta	3,379	,066	,002		

Za účelom detekcie súvislosti medzi hodnotou eGFR a adiponektinémiou sme skonštruovali mnohopočetný lineárny regresný model. Dependentnou premennou bola plazmatická koncentrácia adiponektínu, prediktory boli vek, pohlavie, diabetes mellitus a hodnota eGFR. Durbinov-Watsonov test nepreukázal prítomnosť autokorelácie v našom modeli ($D-B = 1,921$). Observáciou rozptylových diagramov sme potvrdili linearitu vzťahu kolektívne medzi všetkými prediktormi a aj medzi jednotlivými kontinuálnymi prediktormi a adiponektinémiou zvlášť, avšak zistili sme porušenie podmienky homoskedasticity. Na základe nálezu heteroskedasticity v modeli sme ďalej pokračovali metódou váženej regresie najmenších štvorcov s doprednou elimináciou nesignifikantných premenných. Vypočítané hodnoty inflačných faktorov variancie ($1,086 - 1,507$) vylúčili multikolinearitu. Výsledný regresný model štatisticky významne predikoval adiponektinémiu ($F(2,47) = 3,858$; $p = 0,028$; $\text{Adj.}R^2 = 0,104$), pričom jediným štatisticky významným kontribútorom bola hodnota eGFR. Súhrnná štatistika regresného modelu je uvedená v tabuľke 3.

Tabuľka 3
Koefficienty^{a,b}

Model	Beta	Štandard. koefficienty	t	Sig.	95 % konfidenčný interval pre B	
					Spodný	Horný
1	(Konštanta)		2,414	,020	2,570	28,253
	Vek	-,064	-,403	,689	-,176	,117
	eGFR	-,404	-2,564	,014	-,159	-,019

a. Dependentná premenná: Adiponektín

b. Regresia najmenších vážených štvorcov

Napokon sme skonštruovali lineárny regresný model zameraný na detekciu potenciálneho vplyvu premenných KtV a veľkosti ultrafiltrácie v rámci týždňového dialyzačného cyklu (UFw) na hodnoty adiponektinémie. Technika doprednej eliminácie umožnila identifikovať efektívny model predikcie adiponektinémie pomocou premenných KtV a UFw, z ktorých jedine hodnota Kt/V mala štatisticky významný prínos, ako je vidno v tabuľke 4. Model bol štatisticky významný ($F(2,29) = 5,151$; $p < 0,012$; $\text{Adj.}R^2 = 0,211$). Premenné Vek, Diabetes mellitus a Pohlavie boli z rovnice eliminované na základe nesplnenia kritéria signifikantnosti. Vzťah KtV a adiponektinémie je vizualizovaný na obrázku 1.

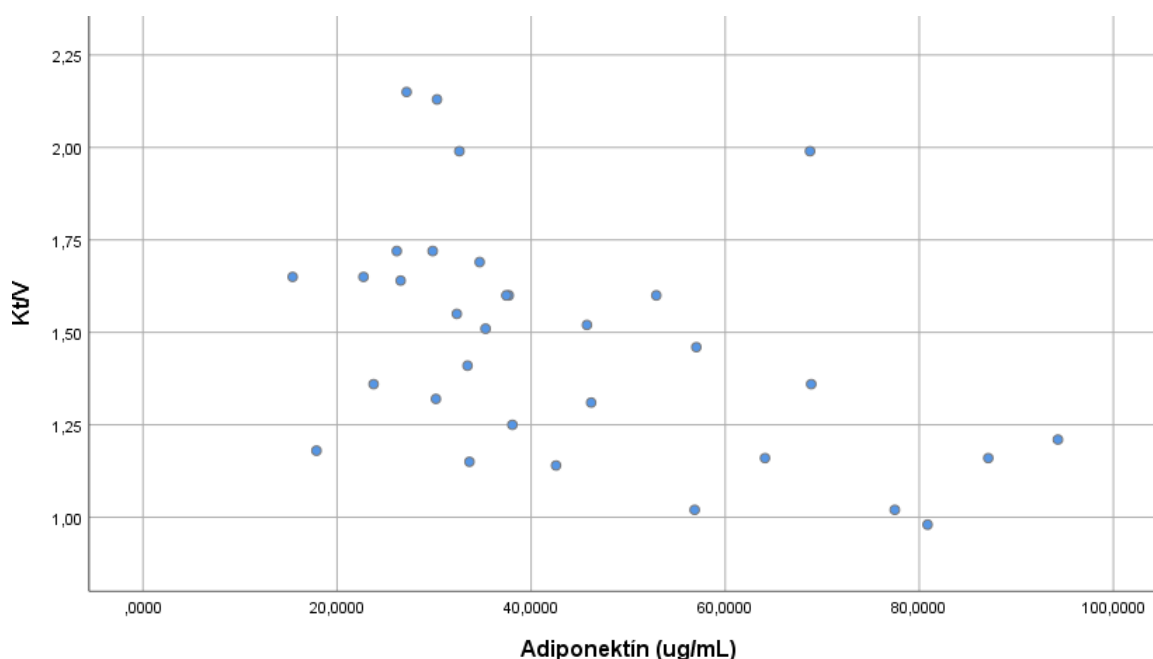
Tabuľka 4
Koeficienty^{a,b}

Model	Beta	Štandard. koeficienty		Sig.	95 % konfidenčný interval pre B	
		t			Spodný	Horný
2. krok	Konštanta		5,498	,000	67,435	147,315
	Kt/V	-,512	-3,209	,003	-70,836	-15,685
	UFw	-,023	-,144	,887	-1,532	1,330

a. Dependentná premenná: Adiponektín

b. Vážená regresia najmenších štvorcov

Obrázok 1



Diskusia

Deskriptívne štatistické porovnanie medzi cieľovou a kontrolnou podskupinou preukázalo jeho štatisticky významne vyššie koncentrácie adiponektínu u dialyzovaných pacientov. Na potvrdenie tohto pozorovania sme na základe dát zozbieraných v praktickej časti tohto projektu skonštruovali logistický regresný model, ktorý potvrdil asociáciu zvýšených hodnôt adiponektinémie s chronickou dialyzačnou liečbou bez ohľadu na ďalšie sledované faktory, včítane veku pacienta, prítomnosť diabetes mellitus či pohlavie pacienta. Analýza našich dát preukázala štatisticky významnú inverznú asociáciu adiponektinémie s hodnotou eGFR. Analogické výsledky boli pozorované aj v štúdiu KNOW-CKD (5). Hoci v našom prípade ide o štatisticky významnú asociáciu, stupeň predikcie adiponektinémie na základe eGFR reprezentovaný hodnotou Adj. R^2 je veľmi malý. To môže byť odrážať tak prítomnosť našou analýzou neadresovaných konfúzných faktorov, ako aj jednosmernosť asociácie adiponektín - eGFR. Z našich výsledkov možno vyvodiť záver existencie štatisticky významnej, hoci veľmi slabej inverznej asociácie adiponektinémie a hodnoty Kt/V. Je dôležité poznamenať, že asociácia adiponektinémie s hodnotou Kt/V nemusí byť kauzálna, ale naopak môže skôr odrážať fenomén dysregulácie viscerálneho tukového tkaniva (6).

Záver

Deskriptívne štatistické porovnanie medzi cieľovou a kontrolnou podskupinou preukázalo štatisticky významne vyššie koncentrácie adiponektínu u dialyzovaných pacientov. Logistický regresný model potvrdil asociáciu zvýšených hodnôt adiponektinémie s chronickou dialyzačnou liečbou. Analýza našich dát preukázala štatisticky významnú inverznú asociáciu adiponektinémie s hodnotou eGFR, ako aj slabej inverznej asociácie adiponektinémie a hodnoty Kt/V. Naše dáta potvrdzujú zaradenie adiponektínu medzi uremické solúty.

Citácie

1. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1645-1656.
2. Christou GA, Kiortsis DN. The role of adiponectin in renal physiology and development of albuminuria. *J Endocrinol.* 2014;221(2):R49-R61.
3. Tsioufis C, Dimitriadis K, Chatzis D, et al. Relation of microalbuminuria to adiponectin and augmented C-reactive protein levels in men with essential hypertension. *Am J Cardiol.* 2005;96(7):946-951.
4. Jia T, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P. The complex role of adiponectin in chronic kidney disease. *Biochimie.* 2012;94(10):2150-2156.

5. Song SH, Oh TR, Choi HS, et al. High serum adiponectin as a biomarker of renal dysfunction: Results from the KNOW-CKD study. *Sci Rep.* 2020;10(1):5598.
6. López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, et al. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;18(1):37-45.

Analýza lymfatickej mikrocirkulácie v psoriatických léziách

Kunertová L.¹, Procházková J.², Adamicová K.³, Výbohová D.¹

¹ Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

² Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

³ Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Cieľom tejto štúdie bolo kvantitatívne porovnanie lymfatickej mikrocirkulácie v chronických psoriatických léziách a v zdravej koži. Analýza sa sústredila na dva hlavné parametre: plochu lymfatických kapilár resp. plochu lymfatických endotelových buniek a expresiu VEGF-C. Na identifikáciu lymfatických kapilár sme použili imunohistochemickú analýzu s Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40, expresiu VEGF-C sme detekovali pomocou Mouse Monoclonal Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4]. Kvantitatívna analýza bola realizovaná morfometrickým softvérom QuickPhoto Micro. Výsledky jednoznačne preukázali, že v psoriatických léziách dochádza k novotvorbe lymfatických kapilár v papilách dermis. Vo všetkých sledovaných topografických oblastiach bola hustota lymfatických kapilár v psoriatických léziách štatisticky významne vyššia ako v zdravej koži. Hustota lymfatických kapilár v léziách psoriasis vulgaris nevykazovala signifikantnú regionálnu variabilitu na rozdiel od zdravej kože. Expresia VEGF-C bola výrazne zvýšená v epidermis psoriatických lézií oproti zdravej koži. Hoci bol nárast zaznamenaný aj v dermis, rozdiel oproti zdravej koži nebol štatisticky signifikantný.

Kľúčové slová: psoriasis vulgaris, lymfatické cievy, podoplanín, VEGF-C

Úvod

Psoriasis vulgaris je chronické zápalové ochorenie kože, ktoré môže mať stacionárny priebeh alebo sa prejavovať akútnymi relapsmi. Ide o multifaktoriálne ochorenie, ktorého výskyt je výrazne ovplyvnený genetickou predispozíciou, ako aj rôznymi vnútornými a vonkajšími faktormi (Braun-Falco et al., 2001). V súčasnosti sa psoriáza považuje za ochorenie sprostredkované T-lymfocytmi (Griffiths & Barker, 2007; Bolognia et al., 2012).

Histopatologický obraz závisí od štádia vývoja psoriatických lézií. V počiatočných štádiách, ako sú psoriatické makuly, sa pozoruje perivaskulárny lymfocytárny infiltrát a zvýraznené cievne štruktúry v edematózných papilách. Epidermis vykazuje akantózu, avšak bez parakeratózy. Pri rozvoji psoriatických papúl sa už objavuje epidermálna hyperplázia s parakeratózou, neutrofilná infiltrácia a tvorba Munrových mikroabscesov (Péč et al., 2006; Murphy et al., 2007; Bolognia et al., 2012).

Zrelé psoriatické plaky sú charakteristické výraznou epidermálnou hyperpláziou, nahromadením zápalových buniek

a kapilárnymi zmenami v povrchovom cievnom plexe. Epidermálna hyperplázia sa prejavuje parakeratózou, spongiózou, hypogranulózou a akantózou. V bazálnej vrstve epidermis sa často vyskytuje bazaloidná hyperplázia. Zápalové bunky, najmä polymorfonukleárne neutrofily, T-lymfocyty, histiocyty a mastocyty, sa hromadia perivaskulárne v dermis a môžu prenikať aj do epidermis. Dermálne papily sú predĺžené a obsahujú rozšírené, kľukaté kapiláry. V oblastiach s výrazne predĺženými papilami je epidermis stenčená a krehká, pričom jej poškodenie môže viesť k drobnému krvácaniu v dôsledku poranenia ciev v blízkosti dermoepidermálnej junkcie (Braun-Falco et al., 2001; Creamer et al., 2002; Péč et al., 2006; Murphy et al., 2007).

Zmeny v mikrocirkulácii krvi sú prítomné už v raných fázach vývoja psoriatických lézií (Creamer et al., 2002) a vyskytujú sa výlučne v cievach subpapilárneho plexu (Creamer, 1997). Hoci kapilárne zmeny samy osebe nie sú primárnou príčinou vzniku lézií, významne prispievajú k udržiavaniu chronického zápalu (Hern et al., 2001).

Informácie o úlohe lymfatickej mikrocirkulácie pri psoriáze sú zatiaľ obmedzené. Predpokladá sa však, že podobne ako pri experimentálnom zápale môže byť lymfangiogenéza súčasťou zápalového procesu aj pri tomto ochorení.

Cieľom tejto štúdie je kvantitatívne porovnať lymfatickú mikrocirkuláciu v chronických psoriatických léziách so zdravou kožou. Analýza sa zameriava na dva parametre: plochu lymfatických kapilár resp. lymfatických endotelových buniek a na expresiu VEGF-C v epidermis et dermis.

Materiál a metódy

Výskumný súbor pozostával z archivovaných vzoriek kože získaných z Ústavu patologickej anatómie JLF UK v Martine. Vzorky pochádzali z chronických psoriatických lézií odobratých z oblastí chrbta, hrudníka, brucha a tváre. Kontrolnú skupinu tvorili vzorky zdravej kože, odobraté z rovnakých anatomických lokalít ako patologické vzorky, pričom pochádzali z kadaverov určených na anatomickú pitvu.

Imunohistochemická analýza

Na identifikáciu lymfatických kapilár (obrázok 1) bola použitá protilátka Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40 (Clone D2-40, Dako, Denmark A/S), ktorá sa viaže na podoplanín – transmembránový sialoglykoproteín považovaný za spoľahlivý marker lymfatických endoteliálnych buniek aj v koži. Expresia VEGF-C (obrázok 2) bola analyzovaná pomocou protilátky Mouse Monoclonal Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4] (Abcam, ab191274, United Kingdom). VEGF-C hrá kľúčovú úlohu pri vývoji venózneho a lymfatického systému počas embryogenézy, ako aj pri udržiavaní a diferenciácii lymfatických endotelových buniek v postnatálnom období (Abcam, 2018).

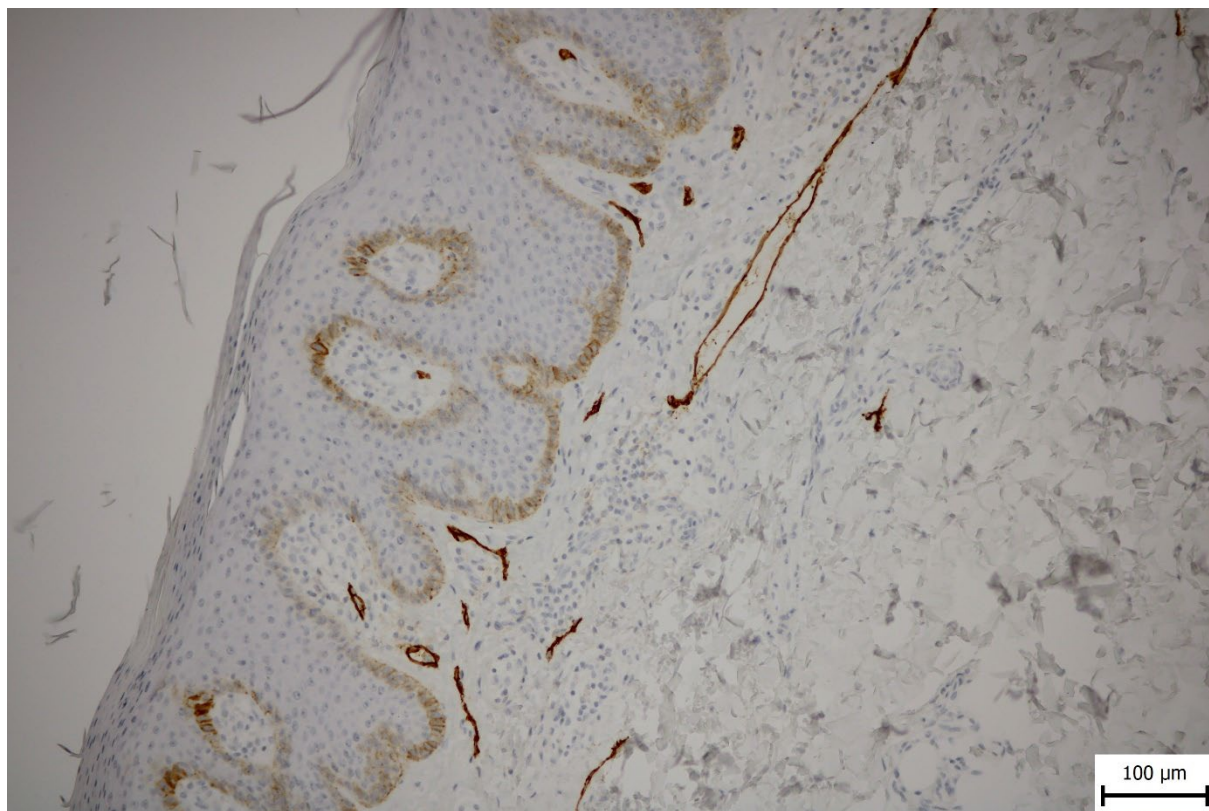
Imunohistochemická analýza bola vykonaná pomocou automatizovaného farbiaceho systému Autostainer Link 48 (Dako). Ako detekčný systém bol použitý Dako EnVision Flex, High pH, pričom chromogénmi boli diaminobenzidín (DAB) a magenta. Kontrastné dofarbenie bolo realizované hematoxylínom (EnVision FLEX Hematoxylin, Dako).

Morfometrické vyhodnocovanie

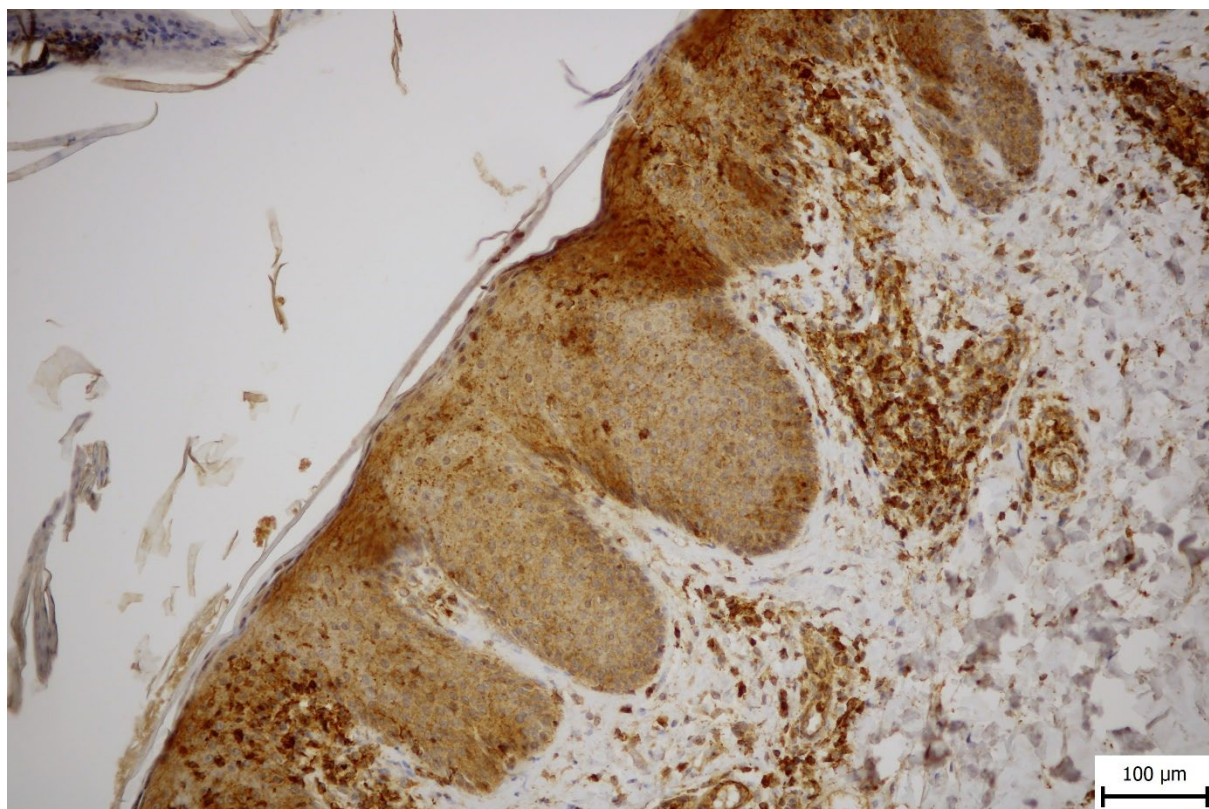
Kvantitatívna analýza bola uskutočnená pomocou morfometrického softvéru QuickPhoto Micro (Promicra, Česká republika). Digitálne obrazy boli analyzované na základe nasledovných parametrov:

Percentuálna plocha lymfatických endotelových buniek – podiel podoplanín-pozitívnej plochy vzhľadom na celkovú plochu obrazu alebo štandardizovanú plochu dermis.

Percentuálna VEGF-C pozitívna plocha – podiel VEGF-C pozitívnej oblasti vzhľadom na celkovú plochu obrazu alebo štandardizovanú plochu dermis.



Obrázok 1 Detekcia lymfatických kapilár v lézii psoriasis vulgaris. Imunohistochemické farbenie s Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40 (Clone D2-40, Dako, Denmark A/S).



Obrázok 2 Expresia VEGF-C v lézii psoriasis vulgaris. Imunohistochemické farbenie s Mouse Monoclonal Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4] (Abcam, ab191274, United Kingdom).

Výsledky

Výsledky našej predchádzajúcej štúdie potvrdili regionálne rozdiely v hustote lymfatických kapilár, preto sme aj hustotu v psoriatických léziách študovali podľa régií (topografických oblastí). Na základe morfometrickej analýzy sme kvantifikovali hustotu lymfatických kapilár prostredníctvom podoplanín-pozitívnej plochy, ktorá predstavuje plochu lymfatických endoteliálnych buniek (tab. 1). Výsledky ukázali, že vo všetkých skúmaných anatomických oblastiach bola percentuálna plocha lymfatických endotelií v psoriatických léziách signifikantne vyššia v porovnaní so zdravou kožou. Na rozdiel od zdravej kože, hustota lymfatických kapilár v léziách psoriasis vulgaris nevykazovala signifikantnú regionálnu variabilitu (Kruskal-Wallis test $p=0,140$).

Štatistická analýza potvrdila, že expresia VEGF-C je signifikantne vyššia v epidermis psoriatických lézií oproti zdravej koži. Hoci bol nárast zaznamenaný aj v dermis, rozdiel oproti zdravej koži nebol štatisticky významný (vid' tabuľka 2 a 3).

Tabuľka 1. Porovnanie podoplanín pozitívnej plochy v léziách psoriasis vulgaris a v zdravej koži.

Anti D2-40	% - podoplanín pozitívna plocha = % - plocha lymfatických endotelií		p - value Mann Whitney test
topografická oblasť	lézie psoriasis vulgaris (n=14)	zdravá koža (n=45)	
regiones dorsii	2,304 ± 0,546	0,485 ± 0,172	0,001
regiones thoracis	1,935 ± 0,313	0,578 ± 0,285	0,002
regiones faciei	2,117 ± 0,653	0,552 ± 0,346	0,011
regiones abdominis	3,858 ± 1,160	0,842 ± 0,179	0,005

Tabuľka 2. Porovnanie expresie VEGF-C v epidermis v léziách psoriasis vulgaris a zdravej koži.

Anti D2-40	% - VEGF- C pozitívna plocha v epidermis		p - value Mann Whitney test
topografická oblasť	lézie psoriasis vulgaris (n=14)	zdravá koža (n=45)	
regiones dorsii	12,340 ± 4,231	5,395 ± 3,059	0,020
regiones thoracis	12,154 ± 0,497	5,279 ± 2,874	0,004
regiones faciei	7,310 ± 1,394	5,618 ± 1,843	0,0136
regiones abdominis	7,194 ± 0,467	4,566 ± 1,519	0,011

Tabuľka 3. Porovnanie expresie VEGF-C v epidermis v léziách psoriasis vulgaris a zdravej koži.

Anti D2-40	% - VEGF- C pozitívna plocha v dermis		p - value Mann Whitney test
topografická oblasť	lézie psoriasis vulgaris (n=14)	zdravá koža (n=45)	
regiones dorsii	5,940 ± 0,863	4,111 ± 1,540	0,058
regiones thoracis	5,403 ± 3,229	3,563 ± 2,375	0,188
regiones faciei	3,832 ± 0,102	3,138 ± 0,989	0,536
regiones abdominis	3,832 ± 0,255	2,925 ± 1,409	0,440

Diskusia

Najnovšie štúdie preukázali, že angiogenéza a lymfangiogenéza, sú úzko spojené nielen s patogenézou kožných nádorov, ale aj s chronickými zápalovými ochoreniami kože (Detmar, 2000; Velasco et al., 2002).

V súvislosti s lymfatickou mikrocirkuláciou pri psoriáze je zatiaľ dostupných len málo štúdií. Naša práca jednoznačne preukázala novotvorbu lymfatických kapilár v dermis psoriatických lézií, pričom vo všetkých sledovaných topografických oblastiach bola hustota lymfatických kapilár signifikantne vyššia ako v zdravej koži. Podobné zistenia publikovali aj Henno et al. (2009), ktorí vo svojej kvantitatívnej imunohistochemickej analýze hodnotili krvnú mikrocirkuláciu (pomocou von Willebrandovho faktora) a lymfatickú mikrocirkuláciu (pomocou anti-D2-40). Aj ich výsledky potvrdili výrazný nárast krvného aj lymfatického riečiska v psoriatických léziách.

Najvýznamnejším stimulom pre lymfangiogenézu sú cytokíny uvoľňované pri zápalových procesoch, ktoré následne indukujú expresiu VEGF-C a VEGF-D (Detmar, 2000; Nagy et al., 2002; Ferrara, 2004). Kľúčovým faktorom lymfangiogenézy v koži je VEGF-C, ktorý je produkovaný keratinocytmi v epidermis ale aj transformovanými

makrofágmi v dermis (Schoppmann et al., 2002; Huggenberger, 2010).

Štúdie na experimentálnych modeloch ukázali, že lymfangiogenéza môže byť indukovaná aj pomocou VEGF-A, avšak kapiláry vytvorené týmto mechanizmom majú abnormálnu morfológiu a poruchy funkcie (Nagy et al., 2002). Stimulácia lymfangiogenézy prostredníctvom VEGF-C však naproti tomu signifikantne inhibuje zápalový proces v koži (Huggenberger et al., 2010). Naše výsledky potvrdili signifikantne zvýšenú expresiu VEGF-C v epidermis psoriatických lézií, pričom v dermis bol nárast tiež zaznamenaný, avšak rozdiel oproti zdravej koži nebol štatisticky významný.

Dôležité zistenia priniesla aj štúdia Skobe et al. (1999), ktorá dokázala, že v ľudských dermálnych endotelových bunkách in vitro VEGF-A indukuje expresiu VEGF-C. Toto zistenie poukazuje na molekulárne prepojenie angiogenézy a lymfangiogenézy, čo vysvetľuje, prečo lymfangiogenéza nasleduje angiogézu, napríklad pri hojení rán alebo pri chronickom zápale v psoriatických léziách (Skobe & Detmar, 2000; Henno et al., 2010).

Hoci štúdie potvrdzujú vzťah medzi zápalom, angiogenezou/lymfangiogenezou a epidermálnou hyperpláziou, detailné patofyziologické a molekulárne mechanizmy týchto procesov nie sú ešte úplne objasnené a vyžadujú ďalšie dôkladné štúdium. Pochopenie vzájomného vzťahu týchto mechanizmov by mohlo byť kľúčové pre vývoj nových terapeutických stratégií. Inhibícia angiogenézy alebo naopak aktivácia lymfangiogenézy by mohla predstavovať sľubný prístup, ktorý by viedol k modulácii zápalových reakcií a zlepšeniu klinických výsledkov u pacientov trpiacich chronickými zápalovými ochoreniami kože, ako je napríklad aj psoriáza. Tento prístup by mohol poskytnúť nové možnosti pre ciele terapiu, ktorá by nielen zmiernila zápalové symptómy, ale aj zlepšila celkovú regeneráciu tkaniva.

Použitá literatúra

Abcam. Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4]. Abcam Product Datasheet. Retrieved January 11, 2018, from <https://www.abcam.com/vegfc-antibody-197ct734-ab191274.html>.

Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002;1(3):219–227. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00051-X.

Bolognia J, Jorizzo JL, Schaffer JV. *Dermatology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012. ISBN: 978-0723435716.

Braun-Falco O, Plewig G, Wolf HH. *Dermatológia a venerológia* (1st ed.). Martin: Osveta; 2001. ISBN: 80-8063-080-1.

Creamer D, Allen MH, Sousa A, et al. Localisation of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 1997;136(6):859–865.

Creamer D, Sullivan R, Bicknell J, Barker JNW. Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis* 2002;5(4):231–236.

Detmar M. The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci* 2000;24(Suppl 1):S78–S84.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581–611.

Griffiths CEM, Barker JNW. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007;370:263–271.

Henno A, Blacher S, Lambert C, et al. Altered expression of angiogenesis and lymphangiogenesis markers in the

uninvolved skin of plaque-type psoriasis. *Br J Dermatol* 2009;160(3):581–590. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08889.x.

Henno A, Blacher S, Lambert CA, et al. Histological and transcriptional study of angiogenesis and lymphangiogenesis in uninvolved skin, acute pinpoint lesions and established psoriasis plaques: an approach of vascular development chronology in psoriasis. *J Dermatol Sci* 2010;57(2):162–169. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.12.006.

Hern S, Allen MH, Sousa AR, et al. Immunohistochemical evaluation of psoriatic plaques following selective photothermolysis of the superficial capillaries. *Br J Dermatol* 2001;145(1):45–53.

Huggenberger R, Ullmann S, Proulx ST, et al. Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. *J Exp Med* 2010;207(10):2255–2269.

Murphy M, Kerr P, Grant-Kels JM. The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007;25:524–528.

Nagy JA, Vasile E, Feng D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;196(11):1497–1506.

Péč J, Chromej I, Martínásková K, et al. Chronická ložisková psoriáza: komplexný pohľad na problematiku a biologická liečba. Banská Bystrica: Dali; 2006. ISBN: 80-89090-21-4.

Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:14–19.

Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002;161(3):947–956.

Velasco P, Lange-Asschenfeld B. Dermatological aspects of angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002;147(6):841–852.

Antidotum inhibítora faktora Xa pri gynekologickom krvácaní ohrozujúcom život

Kasajová P.¹, Kubisová Z.¹, Biringerová Z.^{2,3}, Biringer K.¹

¹Gynekologicko-pôrodná klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin

²Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin

³Centrum podpory medicínskeho vzdelávania, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Andexanet alfa je prvý a jediný špecifický liek na reverziu účinku inhibítorov faktora Xa (FXai), ktorý bol navrhnutý tak, aby slúžil ako väzobný cieľ pre inhibítory FXa ako klamný proteín. Sekvestruje inhibítory FXa z väzby na endogénny FXa, čím zvráti antikoagulačný účinok inhibítorov FXa. Od roku 2024 je dostupný v SR pre pacientov so život ohrozujúcim alebo nekontrolovaným krvácaním počas liečby inhibítorom FXa (apixabán, rivaroxabán alebo edoxaban tosilát hydrát). Bezpečnosť a reverzný účinok andexanetu alfa na antikoagulačnú aktivitu sprostredkovanú inhibítorom FXa u zdravých dospelých sa potvrdili viacerými klinickými štúdiami. Autori predkladajú kazuistiku prvého známeho úspešného podania andexanetu alfa v prípade gynekologického krvácania ohrozujúceho život u 50 ročnej polymorbídnej pacientky v Slovenskej republike.

Kľúčové slová: krvácanie, Andexanet alfa, rivaroxabán, inhibítory FXa

Úvod

Počet prípadov krvácania neustále rastie s tým, ako narastá užívanie inhibítorov faktora Xa (FXa). V USA v roku 2019 bolo hospitalizovaných približne 520 pacientov denne s krvácaním súvisiacim s inhibítorom faktora Xa (FXa) (IBM Watson Health, 2019). Po hospitalizácii v dôsledku krvácania súvisiaceho s inhibítorom faktora Xa (FXa) zomrelo približne 90 pacientov denne (Piccini et al., 2014, Held et al., 2015).

Andexanet alfa je prvý a jediný špecifický liek na reverziu účinku inhibítorov faktora Xa (FXai). Ide o rekombinantnú formu ľudského proteínu FXa, ktorá bola modifikovaná tak, že jej chýba enzymatická aktivita Fxa. Serín aktívnych miest bol nahradený alanínom, čo spôsobuje, že molekula nie je schopná štiepiť a aktivovať protrombín, pričom doména kyseliny gama-karboxyglutámovej (Gla) bola odstránená, aby sa eliminovala schopnosť proteínu zlúčiť sa do protrombinázového komplexu, čím sa odstráni akékoľvek prokoagulačné účinky (Milling et al., 2023).

Liek je indikovaný pre dospelých pacientov liečených priamym inhibítorom faktora Xa (FXa) (apixabán alebo rivaroxabán) v prípade, ak je potrebné zvrátenie antikoagulačného účinku z dôvodu život ohrozujúceho alebo nekontrolovaného krvácania. Medzi kontraindikácie patrí precitlivosť na liečivo alebo na ktorúkoľvek z ďalších zložiek. Známa je alergická reakcia na škrečie proteíny (SPC lieku Ondexxya, 12/2023).

Dávkovacie režimy – závisia od typu inhibítora FXa, jeho poslednej dávky a času od poslednej dávky

Inhibítor FXa*	Posledná dávka	Čas od poslednej dávky	
		<8hod	≥8hod
Apixabán	≥ 5 mg	Nízka	Nízka
	< 5 mg	Vysoká	Nízka
Rivaroxabán	≤ 10 mg	Nízka	Nízka
	> 10 mg	Vysoká	Nízka

Ak nie je známa hmotnosť poslednej dávky antikoagulancia alebo časový interval medzi poslednou dávkou a epizódou krvácania, odporúčanie týkajúce sa dávkovania nie je k dispozícii. Klinické rozhodnutie o začatí liečby má byť podporené stanovením východiskovej hodnoty anti-FXa (ak je táto hodnota dostupná v akceptovateľnom časovom rámci) (SPC lieku Ondexxya, 12/2023).

Andexanet alfa je od roku 2024 dostupný v SR a jeho použitie je podložené randomizovanými klinickými štúdiami a viacerými štúdiami z reálnej klinickej praxe (Siegal et al., 2015, Connolly, 2023, Fermann et al., 2023, Sutton et al., 2023). Maximálne zvrátenie aktivity anti-FXa sa dosiahlo v priebehu dvoch minút po ukončení podávania bolusu (Siegal et al., 2015). Poskytuje sa pri ústavnej starostlivosti (hospitalizácii) a je plne hrađený zo zdravotného poistenia.

Čo sa týka príčin krvácania v gynekológii a pôrodnictve, rozdeľujeme ich na organické a funkčné. Medzi organické patria napríklad myómy, polypy, hyperplázia endometria, malignita krčka maternice alebo endometria, infekcie (endometritída), ďalej adenomyóza, gravidita (abortus in cursu, ektopická gravidita) a poruchy zrážanlivosti krvi. Medzi funkčné príčiny (dysfunkčné krvácanie) zaraďujeme abnormálne krvácanie z anatomicke normálnej maternice, najčastejšie ide o krvácanie z hyperproliferáčného endometria (Zikan, Dubová, 2022).

Kazuistika

Polymorbídna 50 ročná pacientka bola prijatá na Gynekologicko-pôrodnú kliniku JLF UK a UNM z dôvodu dvojtyždňového krvácania, pričom intenzita bola 4-5 prekrvácaných plienok denne. Subjektívne sa cítila slabá, no nekolabovala. Bolesť hlavy, podbrušia, nauzeu, hučanie v ušiach negovala, s močením a so stolicou ťažkosti neudávala. Laboratórne parametre pri prijíme boli v norme, pričom hodnota hemoglobínu bola 116 g/l (hematokrit 0,34) a ostatné laboratórne výsledky boli bez posunu vrátane základných hemokoagulačných parametrov. V osobnej anamnéze pacientka uvádzala ochorenia ako ischemická choroba srdca, arteriálna hypertenzia, stav po prekonaní bilaterálnej embólie do arteria pulmonalis so stredným rizikom v roku 2019, stav po tromboflebitíde v povodí vena saphena magna v oblasti predkolenia a distálnej polovici stehna ľavej dolnej končatiny po vysadení Warfarínu v roku 2020. Okrem vyššie spomínaného mala pacientka v anamnéze uvedený hyperkoagulačný stav (sekundárne vysoká koncentrácia FVII, mutácia génu MTHFR C677T – heterozygotná forma, mutácia génu MTHFR A 1298 C – homozygotná forma), reumatoidnú artritídu, mentálnu retardáciu a zároveň išlo o pacientku s exogénnou obezitou. Čo sa týkalo operácií, v roku 2002 podstúpila cisársky rez, v r.2005 laparoskopiu pre endometrióm ovária, v apríli 2024 frakcionovanú kyretáž a v júni 2024 termoabláciu endometria (snaha o definitívne riešenie krvácania z maternice). Po dohovore s pacientkou jej bolo navrhnuté definitívne riešenie pri potrebe dlhodobej antikoagulačnej liečby: totálna laparoskopická hysterektómia s bilaterálnou adnexektómiou. Po prijatí pacientky bolo realizované hematologické konziliárne vyšetrenie, pričom operačný výkon (s vysokým rizikom krvácania) bolo možné realizovať na 3.deň od vysadenia rivaroxabánu a do výkonu jej bola odporúčaná aplikácia nízkomolekulových heparínov (LMWH). Neodkladnou súčasťou výkonu je dôsledná hemostáza, kontrola krvácaných prejavov a prevencia recidívy venózneho tromboembolizmu (VTE). Prvú dávku LMWH po operácii je možné podať najskôr o 6-8 hodín podľa miery krvácania. V rámci sekundárnej profylaxie VTE je potrebné pokračovať v dávkovaní LMWH. Rivaroxabán je vhodné vrátiť do liečby najskôr 3. deň po operácii.

Pacientke bol vykonaný operačný výkon - Hysterectomy totalis cum adnexectomy bilateralis per laparoscopia, pričom pooperačný priebeh bol bez komplikácií. Na 2.deň bol konzultovaný hematológ po kontrole antiXa faktora (A-Xa-LMWH: 0,54). Pacientka bola demitovaná na 3.deň po operácii bez subjektívnych ťažkostí s odporúčaním aplikácie LMWH do 7 dní od operácie, následne prechod na chronickú antikoagulačnú liečbu rivaroxabánom. Na 8.deň od operácie bola pacientka privezená ambulanciou rýchlej zdravotnej pomoci pre zakrvácanie z rodidiel a s údajom krvavého moču. V daný deň ráno jej bola do liečby vrátená chronická terapia rivaroxabánom. Subjektívne udávala bolesti v oblasti krížov obojstranne a v podbruší. Pri gynekologickom vyšetrení v spekulách bola v pošve prítomná čerstvá krv v množstve cca 100-150 ml a po dezinfekcii a toalete pošvy bolo vizualizované krvácanie z vrcholu pošvového pahýľa (najskôr pomedzi stehy), pričom aspexiou a

palpačne nebola nájdená jednoznačná dehiscencia sutúry pahýľa po hysterektómii. Pri transvaginálnom ultrazvukovom vyšetrení bola oblasť malej panvy bez prítomnosti voľnej tekutiny. Do pošvy jej bolo naložené lokálne hemostatikum a pošvová tamponáda ako forma mechanickej hemostázy. Následne bola pacientke vykonaná kontrola krvácania, avšak hemostatikum i tamponáda pošvy boli pretečené čerstvou krvou počas cca 5 minút. Po extrakcii bolo viditeľné intenzívne krvácanie z pošvového pahýľa medzi stehmi. Vzhľadom na pretrvávajúce krvácanie z pošvového pahýľa sme konzultovali Klinikum anestéziológie a intenzívnej medicíny JLF UK a UNM. Pacientke bolo odporúčané podanie antidótu rivaroxabánu – andexanet alfa po určení dávkovania hematológom. Pri prijatí boli realizované krvné odbery s posunom laboratórnych parametrov - hemoglobín: 104 g/l, hematokrit: 0,31. Pacientka sa subjektívne cítila slabá a unavená. Pacientke bolo odporúčané chirurgické ošetrenie zdroja krvácania v oblasti pošvového pahýľa z vitálnej indikácie. V úvode do celkovej anestézie bol pacientke podaný antagonistu rivaroxabánu - andexanet alfa i.v. v dávke 400 mg bolus a následne 600 mg v kontinuálnej infúzii na 120 min. rýchlosťou 30 ml / hod. Krvácanie bolo zastavené do 2 minút od jeho podania! Pacientka bola počas operačného výkonu tlakovo a pulzovo stabilizovaná, podobne aj saturácia krvi kyslíkom bola v norme. Podali sme 1 čerstvú mrazenú plazmu (ČMP), 1 transfúziu jednotku erytrocytárneho koncentrátu a infúziu terapiu. Peroperačne bol pošvový pahýľ bez dehiscencie a bolo vizualizované difúzne presakovanie čerstvou krvou z okrajov sutúry bez jednoznačného arteriálneho zdroja. Vykonali sme hemostatickú sutúru apexu pošvy, aplikovali sme lokálne hemostatikum a pošvovú tamponádu. Odhadovaná krvná strata od prijmu pacientky po ukončení operačného výkonu bola cca 500 ml. Následne bola pacientka privezená z operačnej sály pri vedomí, podali sme ČMP (266ml) + erytrocytárny koncentrát (227ml). Vitálne funkcie mala v norme: TK 139/72mmHg, P: 89/min., TT: 36,0°C, SpO₂ 95%, diuréza: 1.100 ml číreho moču. Následne jej bola podaná LMWH profylaxia podľa hodnôt antitrombínu III a A-Xa-LMWH. Na 4. deň po revízii a sutúre pošvového pahýľa (13. deň po hysterektómii) bola pacientka demitovaná do ambulantnej starostlivosti bez subjektívnych ťažkostí s odporúčením pokračovať v terapii LMWH po dobu 1 mesiaca a následne prechod na chronickú antikoagulačnú terapiu rivaroxabánom.

Záver

Andexanet alfa je modifikovaný rekombinantný ľudský faktor Xa (FXa), ktorý bol navrhnutý tak, aby slúžil ako väzobný cieľ pre inhibítory FXa ako klamný proteín. Sekvestruje inhibítory FXa z väzby na endogénny FXa, čím zvráti antikoagulačný účinok inhibítorov FXa. Od roku 2024 je dostupný v SR pre pacientov so život ohrožujúcim alebo nekontrolovaným krvácaním počas liečby inhibítorom FXa (apixaban, rivaroxaban alebo edoxaban tosilát hydrát). Bezpečnosť a reverzný účinok andexanetu alfa na antikoagulačnú aktivitu sprostredkovanú inhibítorom FXa u

zdravých dospelých sa potvrdili viacerými klinickými štúdiami (Yajima et al., 2023). Andexanet alfa je schváleným reverzným činidlom pre inhibítory FXa v SR a očakáva sa, že prispeje k zlepšeniu prognózy u pacientov so smrteľným a/alebo nekontrolovaným krvácaním včasným zvrátením antikoagulačného účinku inhibítorov FXa. Prezentovaná kazuistika predstavuje prvý známy prípad úspešného podania andexanetu alfa u pacientky s krvácaním ohrozujúcim život v gynekológii v Slovenskej republike.

Použitá literatúra

Connolly SJ. Prezentácia na: WSC; 10.-12. október 2023; Toronto, Kanada.

Fermann GJ et al. Prezentácia na: SAEM Congress; 16.-19. máj 2023; Austin, TX, USA.

Held C, Hylek EM, Alexander JH, et al. Clinical outcomes and management associated with major bleeding in patients with atrial fibrillation treated with apixaban or warfarin: insights from the ARISTOTLE trial. *Eur Heart J.* 2015;36(20):1264-1272.

IBM Watson Health. Alexion Bleed Report. Data month ending September 2019.

Milling et al. Final Study Report of Andexanet Alfa for Major Bleeding With Factor Xa Inhibitors *Circulation.* 2023;147:1026–1038.

Online: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057844>

Piccini JP, Garg J, Patel MR, et al. Management of major bleeding events in patients treated with rivaroxaban vs. warfarin: results from the ROCKET AF trial. *Eur Heart J.* 2014;35(28):1873-1880.

Siegel DM, Curnutte JT, Connolly SJ, et al. *N Engl J Med* 2015; 373:2413-2424; DOI: 10.1056/NEJMoa1510991.

SPC lieku Ondexxya, posledná aktualizácia 12/2023, dostupné online na www.sukl.sk.

Sutton et al. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* (2023) 56:137–146. Online: <https://doi.org/10.1007/s11239-023-02820-y>

Zikán, M., Dubová O., 2022, ISBN 9788073457167

Yajima T, et al. [Andexanet alfa (ONDEXXYA) for Intravenous Injection 200 mg), a reversal agent for direct factor Xa inhibitors: pharmacological characteristics and clinical evidence]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2023;158(1):89-100. doi: 10.1254/fpj.22107.

Detekcia RNA a DNA vírusov v odpadových vodách – preliminárna štúdia

Samec, M.¹, Samec, I.², Pěč, M.^{1*}, Pěčová, R.³, Lúčanský, V.³, Franeková, M.¹

¹ Ústav lekárskej biológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

² Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

³ Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

* korešpondenčný autor: prof. MUDr. Martin Pěč, PhD., MPH

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Univerzita Komenského v Bratislave

Ústav lekárskej biológie

Malá Hora 4

036 01 Martin

tel: +421 43 2633 440 e-mail: martin.pec@uniba.sk

Abstrakt

Epidemiológia založená na analýze odpadových vôd (WBE) predstavuje perspektívnu metódu na včasnú detekciu a priebežné monitorovanie rôznych patogénov. Táto epidemiologická stratégia v poslednom období zaznamenala výrazný výskumný záujem. Počas pandémie SARS-CoV-2 bol WBE zhodnotený ako doplnkový nástroj sledovania na mapovanie šírenia vírusu v populácii. Napriek tomu, že táto metóda má veľký potenciál na monitorovanie patogénov na lokálnej aj národnej úrovni, existujú určité obmedzenia, najmä prítomnosti vysokých koncentrácií inhibítorov, ktoré kontaminujú extrahované nukleové kyseliny z odpadových vôd, čo môže viesť k falošne negatívnym výsledkom. Táto štúdia sa zameriava na detekciu RNA a DNA vírusov, konkrétne SARS-CoV-2 a adenovírusu, v odpadových vodách prostredníctvom ddPCR. Optimalizovali sme testy na detekciu RNA a DNA vírusov prítomných v odpadových vodách. Výsledky našej preliminárnej štúdie poukazujú nato, že WBE predstavuje sľubný prístup k monitorovaniu patogénov, ako sú SARS-CoV-2 a adenovírus, avšak na zvýšenie presnosti detekcie je potrebné riešiť problémy, ako sú kontaminanty v odpadových vodách.

Kľúčové slová: vírusy, ddPCR, epidemiológia, odpadové vody

Úvod

Výskyt virálnych ohnisk, lokálnych ako aj ďalších globálnych pandémie je v súčasnosti náročné predvídať. Pandémie spôsobené vírusmi majú výrazný dopad na spoločnosť po celom svete, čo bolo možné sledovať počas poslednej globálnej pandémie spôsobenej vírusom SARS-CoV-2 (Rashid et al., 2023). Klasická epidemiológia a jej systémy manažmentu sú založené na diagnostike vzoriek, získaných od pacientov s klinickými symptómami, avšak tento prístup nie je optimálny na odhalenie vírusových epidémii, ktoré sú v počiatočnom štádiu. Je to spôsobené tým, že nie je možné diagnostikovať všetky infikované osoby a to najmä kvôli časovému oneskoreniu medzi infekciou, klinickými príznakmi a samotnou diagnózou. Takéto infikované, ale nediagnostikované osoby následne šíria vírus v populácii, čo predstavuje hlavnú príčinu vzniku epidémie ešte pred tým, než sú zachytené zdravotnými pracovníkmi. To bol aj hlavný dôvod, prečo klinické testovanie nezaznamenalo epidémiu SARS-CoV-2 v počiatočnej fáze a umožnilo jej rozvinutie do globálnej pandémie (Burrell et al., 2017).

Komunálne odpadové vody predstavujú dôležitý rezervoár biologického materiálu, ktorý odráža komplexné zdravotné informácie o celej komunite, je neoceniteľný zdroj informácií o stave verejného zdravia. Nefiltrovaná odpadová voda je univerzálnou vzorkou, pretože pozostáva z mestskej, priemyselnej odpadovej vody ako aj z dažďovej vody. Táto voda obsahuje ľudské sekréty ako je moč, stolica, zvratky a samozrejme aj vodu používanú na umývanie a dentálnu hygienu. Táto voda teda predstavuje významný zdroj rôznych biomarkerov, ktoré je možné využiť pri monitorovaní verejného zdravia. Tento prístup je známy ako epidemiológia založená na monitorovaní odpadových vôd (WBE), ktorého cieľom je určiť expozíciu patogénom na úrovni celej populácie (Bowes et al., 2024). Odpadová voda však okrem biologických entít obsahuje aj veľké množstvo inhibítorov, ktoré interferujú s diagnostickými prístupmi založených na PCR reakcii. Koncentrácia a diverzita týchto inhibítorov je ovplyvnená viacerými faktormi, medzi ktoré patria veľkosť populácie, prítomnosť okolitého priemyslu a poľnohospodárstva ako aj impakt klímy. Tieto aspekty teda môžu predstavovať príčinu, ovplyvňujúca kvalitu údajov produkovaných WBE a potencionálne viesť k chybným epidemiologickým záverom (Burrell et al., 2017)

Digitálna PCR (ddPCR) je nová generácia klasickej PCR, ktorá umožňuje absolútnu kvantifikáciu cieľových nukleových kyselín (Lucansky et al., 2023). Princíp tejto metódy spočíva v jej schopnosti rozdelenia vzoriek do malých bioreaktorov (tzv. dropletov), v ktorých prebiehajú samostatné PCR reakcie (Scott et al., 2023). Technológia ddPCR vykazuje zvýšenú toleranciu voči inhibujúcim látkam v dôsledku distribúcie a separácie jednotlivých mikro-reakcií, čo zmierňuje vplyv inhibítorov na PCR amplifikáciu (Kojabad et al., 2021). To vo výsledku zachováva rozpoznateľný pozitívny signál aj

v prítomnosti miernej inhibície, ktorá môže byť prítomná v droplete. Vzhľadom na jej robustnosť a špecifitu, predstavuje táto metóda optimálny prístup na detekciu virálnych partikul v odpadových vodách a tým optimalizovať monitorovanie epidemiologickej situácii na lokálnej ako aj národnej úrovni. V našej preliminárnej štúdii sme sa zamerali na optimalizáciu metodiky ddPCR na identifikáciu adenovírusov a vírusu SARS-CoV-2 v odpadových vodách. Tieto vírusy predstavujú zástupcov DNA a RNA vírusov, ktoré sú zodpovedné za rozvoj ochorení dýchacieho a tráviaceho traktu.

Materiál a metódy

Izolácia vírusovej RNA

Na extrakciu RNA zo vzoriek odpadovej vody bol použitý komerčne dostupný Zymo Environ (Zymo) kit, ktorý umožňuje zakoncentrovanie vírusov, homogenizáciu vzorky a purifikáciu RNA v rámci jedného protokolu. Na extrakciu sme použili 5 ml odpadovej vody. Do skúmavky sme následne pridali 70 µl Water Concentrating Buffer. Ďalšie kroky boli vykonané v súlade s odporúčaním výrobcu.

Izolácia vírusovej DNA

Na extrakciu DNA zo vzoriek odpadovej vody bol použitý modifikovaný Zymo Environ kit (Zymo), ktorý umožňuje zakoncentrovanie vírusov, homogenizáciu vzorky a purifikáciu RNA a DNA v rámci jedného protokolu. Na extrakciu sme použili 1 ml odpadovej vody. Do skúmavky sme následne pridali 70 µl Water Concentrating Buffer. Ďalšie kroky spočívali v pridaní DNA/RNA Shield™ a DNA/RNA Buffer (Zymo) a boli vykonané po odbornej konzultácii a v súlade s odporúčaním výrobcu.

ddPCR analýza

Detekcia SARS-CoV-2 RNA

Digitálna dropletová PCR s reverznou transkripciou (RT-ddPCR) sa uskutočnila v reakčnom objeme 20 µl, ktorý pozostával zo 17 µl mastermixu a 3 µl vzorky. Mastermix obsahoval 5 µl supermixu, 2 µl reverznej transkriptázy (RT) a 1 µl 300 mM roztoku ditiotritolu (DTT), všetko zahrnuté v One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA), priméry a sondy (tab.1) (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) v konečnej koncentrácii 500 resp. 250 nM. Droplety boli generované automatickým generátorom kvapiek (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) podľa pokynov výrobcu. PCR sa uskutočnila s použitím termocykléra T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) s nasledujúcimi podmienkami cyklovania: aktivácia enzýmu pri 95 °C počas 10 minút, po ktorej nasledovalo 40 cyklov denaturácia pri 94 °C počas 30 s, po ktorej nasleduje anelácia/predlžovanie pri 54 °C počas 1 minúty a stabilizácia kvapiek pri 98 °C počas 10 minút. Vzorky sa potom analyzovali pomocou QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA).

Tabuľka 1. Primery a sekvencie na detekciu SARS-CoV-2 (gény Rdrp, E) a GAPDH ako kontroly priebehu PCR reakcie.

Primery	
Názov	Sekvencia (5'→3')
Rdrp Forward	GTGAAATGGTCATGTGTGGCG
Rdrp Reverse	AATGTTAAAAACACTATTAGCATAAGCA
E Forward	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT
E Reverse	ATATTGCAGCAGTACGCACA
GAPDH Forward	AGTCAGCCGCATCTTCTTTT
GAPDH Reverse	CCCAATACGACCAAATCCGT
Sondy	
Názov	Sekvencia
Rdrp (HEX-IBFQ)	CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC
E (FAM-IBFQ)	AACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG
GAPDH (HEX-IBFQ)	GCGTCGCCAGCCGAGCCACA

Tabuľka 2. Primery a sekvencie na detekciu Adenovírusov a mtDNA ako kontroly priebehu PCR

Primery	
Názov	Sekvencia (5'→3')
Adeno Forward	GCCACGGTGGGGTTTCTAACTT
Adeno Reverse	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC
mtDNA Forward	TCACTCCTTGGCGCCT
mtDNA Reverse	CGGTTGAGGCGTCTGG
Sondy	
Názov	Sekvencia
Adeno (HEX-IBFQ)	TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA
mtDNA (FAM-BHQ1)	CAAATCACCACAGGACTATTCCTAGCCA

Detekcia Adenovirálnej DNA

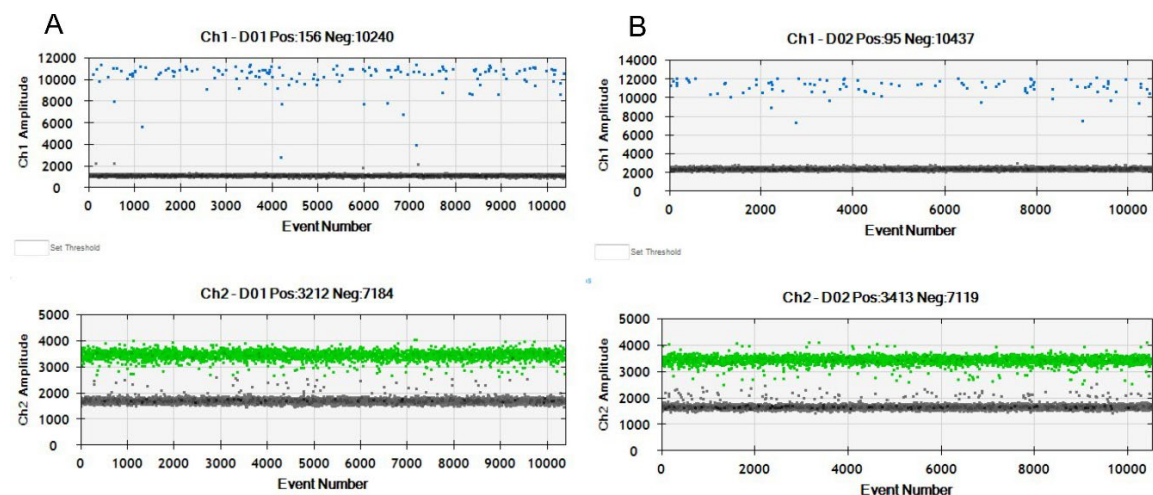
RT-ddPCR sa uskutočnila v reakčnom objeme 20 µl, ktorý pozostával zo 10 µl mastermixu a 10 µl vzorky. Mastermix obsahoval 5 µl supermixu, 2 µl reverznej transkriptázy (RT) a 1 µl 300 mM roztoku ditiotritolu (DTT), všetko zahrnuté v One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA), priméry a sondy (tab.2) (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika) v konečnej koncentrácii 500 resp. 250 nM. Droplety boli generované automatickým

generátorom kvapiek (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) podľa pokynov výrobcu. PCR sa uskutočnila s použitím cykléra T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA) s nasledujúcimi podmienkami cyklovania: aktivácia enzýmu pri 95 °C počas 10 minút, po ktorej nasledovalo 40 cyklov denaturácia pri 94 °C počas 30 s, po ktorej nasleduje anelácia/predlžovanie pri 55 °C počas 1 minúty a stabilizácia kvapiek pri 98 °C počas 10 minút. Vzorky sa potom analyzovali pomocou QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA).

Výsledky

Analýza prítomnosti SARS-CoV-2 v odpadovej vode

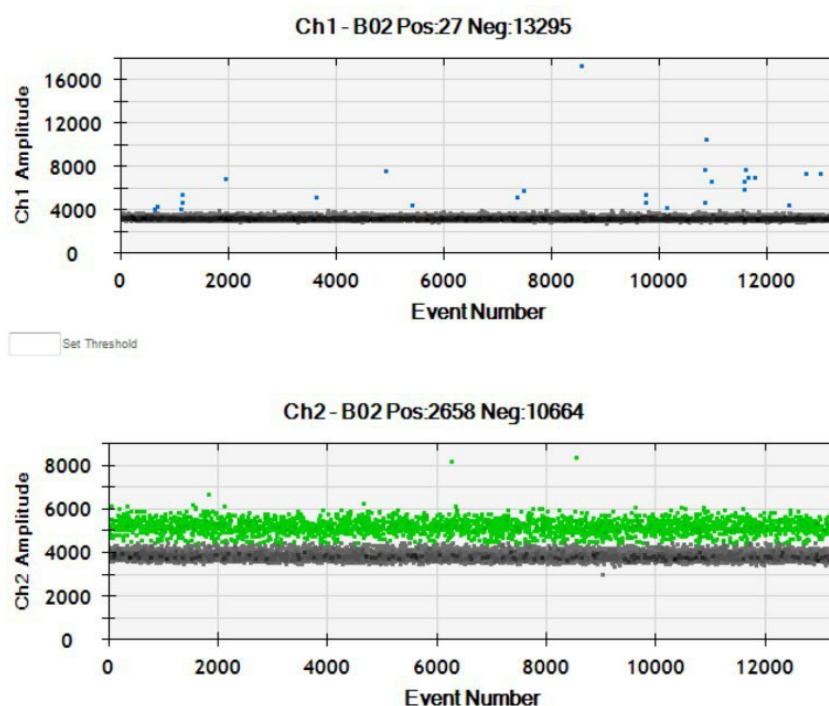
S využitím komerčne dostupného kitu na izoláciu vírusovej RNA z odpadových vôd a následnou analýzou sme detegovali prítomnosť vírusovej RNA pre gény Rdrp (obr. 1A, modré bodky) a gén E (obr. 1B, modré bodky) vo vzorke odpadovej vody. Dôkaz priebehu PCR reakcie dokumentuje prítomnosť GAPDH RNA (Obr. 1A a B, zelené bodky) v analyzovanej vzorke.



Obrázok 1. Detekcia prítomnosti SARS-CoV-2 v odpadových vodách. Obrázok 1A (vyššie) poukazuje na prítomnosť vírusovej RNA pre gén Rdrp. Obrázok 1B (vyššie) dokumentuje prítomnosť vírusovej RNA pre gén E. Obrázky 1A a 1B (nižšie) poukazujú na prítomnosť RNA pre GAPDH.

Analýza prítomnosti Adenovirálnej DNA v odpadovej vode

S využitím modifikovaného kitu na izoláciu vírusovej DNA/RNA z odpadových vôd a následnou analýzou sme detegovali prítomnosť vírusovej DNA špecifickú pre adenovírusy (obr. 2, modré bodky) vo vzorke odpadovej vody. Dôkaz priebehu PCR reakcie dokumentuje prítomnosť mtDNA (Obr. 2, zelené bodky) v analyzovanej vzorke.



Obrázok 2. Detekcia prítomnosti adenovírusov v odpadových vodách. Obrázok 2 (vyššie) poukazuje na prítomnosť vírusovej DNA. Obrázok 2 (nižšie) dokumentuje prítomnosť mtDNA.

Diskusia

Monitorovanie odpadových vôd zahŕňa zber vzoriek z komunálnych alebo inštitucionálnych kanalizačných systémov (Dutta et al., 2022). Pre dohľad na úrovni komunity sú kanalizácie univerzálnym nástrojom, ktorý zhromažďuje ľudský odpad do centralizovaných lokalít. Odber vzoriek sa však môže vykonávať v oveľa lokalizovanejších mierach a v komunitách, ktoré nemajú centralizovaný systém zberu a čistenia odpadových vôd. Odber vzoriek z centralizovaných lokalít môže poskytnúť bohatý pohľad o prítomnosti patogénnych vírusov, baktérii a prvokov prítomných v komunite. Patogény, ktoré sú stabilné v odpadových vodách alebo sú neustále vylučované v stolici alebo moči, predstavujú významných kandidátov na monitorovanie epidemiologickej situácie na lokálnej aj národnej úrovni (Diamond et al., 2022). Aj keď monitoring odpadových vôd na prítomnosť týchto patogénov predstavuje vhodný nástroj, širšia aplikácia tohto prístupu je limitovaná niekoľkými faktormi (Corpus et al., 2022). Ako sa ukázalo v priebehu pandémie SARS-CoV-2, inherentné zloženie vôd a značne zriedenie samotného vírusu SARS-CoV-2 v odpadových vodách predstavovali výrazný problém pri interpretácii epidemiologických dát. Okrem toho, súčasne metódy detekcie prítomnosti patogénov v kanalizačných systémov zahŕňajú využitie reverznej transkripčnej polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR) a kvantitatívnej reverznej transkripčnej polymerázovej reťazovej reakcie (RT-qPCR) – metód založených na detekcii nukleových kyselín. Účinnosť týchto detekčných metód je

však výrazne znížená prítomnosťou látok, ktoré inhibujú PCR reakciu (Corpuz et al., 2022; Scott et al., 2023). Riešenie tejto limitácie predstavuje zavedenie metódy, ktorá kombinuje vysokú citlivosť, robustnosť a zároveň redukuje vplyvy inhibítorov. Jednou z možností predstavuje aplikácia technológie ddPCR. V našej práci sme navrhli a optimalizovali eseje na detekciu prítomnosti RNA ako aj DNA vírusov v odpadových vodách s využitím metódy ddPCR. V rámci našej štúdie sme použili komerčne dostupný izolačný Zymo Environ (Zymo) kit na extrakciu RNA z odpadových vôd. Následnou optimalizáciou tohto kitu sme získali možnosť detegovať aj prítomnosť DNA vírusov. Metóda RT-ddPCR bola zvolená pre analýzu DNA z dôvodu optimalizácie izolačného postupu, pri ktorom by sa DNA a RNA extrahovali spoločne v jednom eluáte. Následná detekcia RNA aj DNA vírusov v jednej reakcii využívala reakčný mix obsahujúci reverznú transkriptázu na konverziu RNA, zatiaľ čo DNA zostala intaktná. Technológia ddPCR predstavuje vysoko senzitívny prístup na detekciu patogénov ako SARS-CoV-2, čo sme dokumentovali v našej predchádzajúcej štúdii. V danej štúdii sme preukázali schopnosť ddPCR eliminovať problémy s inhibíciou PCR reakcie pri analýze odpadových vôd v porovnaní s rutinne používanou RT-qPCR (Lucansky et al., 2023). Nami použitý izolačný kit a optimalizované eseje detegovali prítomnosť SARS-CoV-2 (RNA vírus) ako aj adenovírusov (DNA vírus) vo vzorkách odpadových vôd. Schopnosť tejto metodiky detegovať aj DNA vírusy poukazuje na široké využitie technológie ddPCR v monitorovaní patogénov bez ohľadu na typ nukleovej kyseliny. Tento prístup umožňuje široké spektrum aplikácií pri monitorovaní nie len lokálnych pandémieí ako je hepatitída C, tuberkulóza alebo chrípka, ale aj globálnych pandémieí ako to bolo možné sledovať počas pandémie SARS-CoV-2.

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1-0261-22.

Použitá literatúra

Bowes DA, Driver EM, Choi PM, et al. Wastewater-based epidemiology to assess environmentally influenced disease. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*. Nature Publishing Group; 2024 May;34(3):387–8.

Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Epidemiology of Viral Infections. *Fenner and White's Medical Virology*. 2017;185–203.

Corpuz MVA, Buonerba A, Zarra T, et al. Advances in virus detection methods for wastewater-based epidemiological applications. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* [Internet]. 2022 Dec ;6:100238.

Diamond MB, Keshaviah A, Bento AI, et al. Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses. *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2022 Oct;28(10):1992–5.

Dutta H, Kaushik G, Dutta V. Wastewater-based epidemiology: a new frontier for tracking environmental persistence and community transmission of COVID-19. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022 Dec;29(57):85688–99.

Kojabad AA, Farzanehpour M, Galeh HEG, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of Medical Virology*. 2021 Jul;93(7):4182–97.

Lucansky V, Samec M, Burjanivova T, et al. Comparison of the methods for isolation and detection of SARS-CoV-2 RNA in municipal wastewater. *Frontiers in Public Health*. 2023 Mar 7;11:1116636.

Rashid SA, Nazakat R, Muhamad Robat R, et al. Droplet digital PCR application for the detection of SARS-CoV-2 in air sample. *Frontiers in Public Health*. 2023 ;11.

Scott G, Evens N, Porter J, Walker DI. The Inhibition and Variability of Two Different RT- qPCR Assays Used for Quantifying SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *Food and Environmental Virology*. 2023;15(1):71–81.

Efekt veku a ischemického poškodenia na biomolekuly

Babušíková E.¹, Dobrota D.¹, Matáková T.¹, Hošala M.²

¹ Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

² Klinika všeobecnej, viscerálnej a transplantáčnej chirurgie,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Starnutie je prirodzený fyziologický proces každého živého organizmu. Počas starnutia postupne nastávajú zmeny, ktoré sú často spojené s negatívnym dopadom na telesné funkcie, kognitívne funkcie a zdravie. S postupujúcim vekom je organizmus oveľa viac náchylnejší na rôzne ochorenia a medzi nimi aj na mozgovú cievnu príhodu (ischémia). V našom projekte sme sledovali vplyv starnutia a in vivo indukovanej ischémie na oxidačné poškodenie mozgu. Sledovali sme tri parametre: fluorescenciu dityrozínu, koncentráciu tiolových skupín a koncentráciu produktov reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), ktoré sme pozorovali u dospelých zvierat (6 mesiacov) a senescentných zvierat (26 mesiacov). S postupujúcim vekom sme pozorovali akumuláciu poškodenia len u fluorescencie dityrozínu. Indukovaná ischémia mala negatívny dopad množstvo dityrozínu ako i TBARS. Hlbšie porozumenie procesom starnutia a ischemického poškodenia nám môže následne napomôcť pri diagnostike, ako i pri vypracovaní nových preventívnych a terapeutických prístupov.

Kľúčové slová starnutie, ischémia mozgu, oxidačné poškodenie

Úvod

Starnutie je prirodzený biologický proces, ktorý je súčasťou života. Starnutie a cievna mozgová príhoda ovplyvňujú zdravie centrálnej nervovej sústavy a ich následky môžu časom viesť k neurodegeneratívnym ochoreniam, ako sú demencia a Alzheimerova choroba. S pribúdajúcim vekom prebiehajú v organizme rôzne fyziologické a biochemické zmeny. V mozgu je možné pozorovať pokles neuroplasticity, schopnosti nervových buniek sa adaptovať a vytvárať nové spojenia.

Starnutie je univerzálny proces, ktorý sa začal so vznikom života asi pred 3,5 miliónmi rokov. Biologické, epidemiologické a demografické údaje tvoria základ mnohých teórií, ktoré sa snažia identifikovať príčinu alebo vysvetliť proces starnutia a jeho neodvratný dôsledok, smrť (Fukagawa et al., 2000; Knight, 2000; Semsei, 2000). Presné mechanizmy starnutia nie sú objasnené, ale experimentálne dôkazy podporujú hypotézu, podľa ktorej sú zmeny pri starnutí dôsledkom

zvyšujúceho sa oxidačného stresu a následného oxidačného poškodenia orgánov, tkanív, buniek a molekúl. V ostatnom čase narastajú experimentálne dôkazy pre vekom závislé zvýšenie tvorby reaktívnych foriem kyslíka a postupnej akumulácii oxidovaných molekúl. Preto sa do popredia dostávajú dve teórie, genetická teória starnutia a voľno-radikálová teória starnutia, ktoré sú v tesnom vzájomnom vzťahu. V roku 1956 D. Harman naznačil, že počas starnutia dochádza k zvyšujúcej sa tvorbe voľných radikálov a navrhol voľno-radikálovú teóriu starnutia. Produkcia vysoko reaktívnych voľných kyslíkových radikálov spôsobuje progresívne, náhodné poškodenia DNA, RNA, enzýmov, ďalších bielkovín, ako aj nenasýtených mastných kyselín a fosfolipidov. Tieto poškodenia môžu napokon viesť k bunkovej smrti. V ostatnom období prišlo k výrazným pokrokom v pochopení funkcie reaktívnych foriem kyslíka v biológii chorôb centrálneho nervového systému, kardiovaskulárneho systému, ako i v procese starnutia (Sies a Jones, 2020).

Ischémia mozgu je stav, keď je dodávka kyslíka a živín do mozgu obmedzená z dôvodu zúženia alebo upchatia ciev. Akákoľvek obmedzená cirkulácia krvi môže viesť k poškodeniu mozgových buniek, ktoré sú mimoriadne citlivé na hypoxiu. V súčasnosti existujú silné dôkazy, že chronické ischémia, spôsobená malými cievnyimi mozgovými príhodami, môže viesť k postupnej dekompenzácií mozgových funkcií, najmä s postupujúcim vekom. Ischémia mozgu je treťou najčastejšou príčinou smrti v západných krajinách po srdcových ochoreniach a rakovine. Mozgová hypoxia ovplyvňuje tak správanie ako aj kognitívne schopnosti človeka a vedie k rôznym neurologickým zmenám. Existuje silné spojenie medzi cerebrovaskulárnymi ochoreniami a Alzheimerovou chorobou. Akumulácia rôznych zmien môže postupne viesť a byť kľúčová pre vznik a rozvoj demencie a Alzheimerovej choroby. Cievna ischemická mozgová príhoda predstavuje tretiu najčastejšiu príčinu smrti (Dirnagl et al. 1999; Kozler, 2002) a takmer 1/6 populácie bude postihnutá mozgovou cievnu príhodou aspoň raz počas života (Seshadri a kol., 2006). Mozog nemá žiadne rezervy kyslíka a len veľmi malé zásoby glukózy, respektíve iných, na energiu bohatých zlúčenín, preto je extrémne citlivý k ischemickému poškodeniu. Ischémia mozgu spôsobuje v skorých štádiách reverzibilné neurochemické a neurobiologické zmeny, ktoré možno zastaviť a umožniť návrat k normálnej funkcii obnovením prietoku krvi—reperfúziou (Račay et al., 2000; Lehotský et al., 2004).

Hoci proces starnutia dodnes nie je jednoznačne definovaný, starnutie predstavuje najrizikovejší faktor vzhľadom na vznik a rozvoj cerebrovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení, pričom s vekom sa výrazne zvyšuje mortalita týchto ochorení (Antignamo et al., 2023). Presné mechanizmy starnutia nie sú objasnené, ale experimentálne dôkazy podporujú hypotézu, podľa ktorej sú zmeny pri starnutí dôsledkom zvyšujúceho sa oxidačného stresu a následného oxidačného poškodenia buniek.

Materiál a metódy

Používané zvieratá

Na štúdium sa použili dospelé (6 mesiacov; 325-375 g) a senescentné (26 mesiacov; 360-460 g) laboratórne potkany rodu Wistar. Zvieratá sa získali z Ústavu experimentálnej farmakológie Slovenskej akadémie vied, Dobrá voda. Zvieratá mali prístup k potrave a k vode ad libitum a boli uskladnené v miestnosti so stálou teplotou vzduchu a 12 hodinovými dennými cyklami. Experimenty boli schválené etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou. Všetky experiment boli vykonané v súlade s Príručkou pre starostlivosť a používanie laboratórných zvierat, ktorú vydal Národný inštitút zdravia USA, ako i s pravidlami vydanými a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky. Bolo vynaložené maximálne úsilie na minimalizáciu utrpenia zvierat a zníženia počtu zvierat.

Model ischémie

Zvieratá boli rozdelené do troch experimentálnych skupín po Globálna ischémia (štvor-cievny podváz) sa indukovala podľa Pulsinelli a Buchan (1988) u 6 a 26 mesačných zvierat 15 minút. Všetky úkony sa robili v halotanovej anestézii. Stručne, prvý deň sa na zadnej strane krku urobil rez stredom chrbtovej strany krku, vyoperovala zadná plocha transverzálnych výbežkov prvého krčného stavca a urobila sa tepelná koagulácia oboch vertebrálnych artérií (arteria vertebralis). Na druhý deň sa vyoperovali obe krčné artérie (arteria carotis), označili polyetylénovými pásikmi a tepelne zatavili, zaklapli sa aneuryzmatickými svorkami a indukovala sa 15 min ischémia. Po ukončení 15 min ischémie sa buď indukovala 120 min reperfúzia, alebo sa zviera dekapitovalo. Ako kontrola sa v experimentoch použili slepo operované zvieratá. Zvieratá sa usmrtili dekapitáciou a vybraný kortex sa použil na analýzu.

Príprava vzoriek mozgu

Kortex bez bazálnych ganglií a hipokampusu sa vyoperoval z lebky a bol homogenizovaný v sklenenom homogenizátore v 1 ml tlmivého roztoku (0,02 mol/l Tris-HCl (pH 7,5), 0,01 mol/l MgCl₂ a 0,05 mol/l NaCl). Po skončení homogenizácie bol homogenizátor premytý 1 ml rovnakého roztoku s kokteilmom proteázových inhibítorov. Homogenát sa centrifugoval na pri 100 000 ot/min a 4°C 10 min. Pelet sa rozsuspendoval v 1 + 1 ml roztoku 0,01 mol/l fosfátový roztok (pH 7,4) and 1% Triton X- 100 a inkuboval sa 60 min pri 0°C. Následne sa vzorka centrifugovala pri 100 000 ot/min a 4°C 10 min. Supernatant – membránová frakcia sa uskladnila pri -80°C až do stanovenia jednotlivých parametrov.

Stanovenie koncentrácie bielkovín

Koncentrácia bielkovín bola stanovená podľa bicinchonínovej metódy (Smith et al., 1985).

Stanovenie oxidačného poškodenia bielkovín a lipidov

Pri oxidačnom poškodení bielkovín sa stanovovalo množstvo dityrozínov a celkovú koncentráciu tiolových skupín bielkovín (Babušíková et al., 2008; Hu, 1994). Ako marker poškodenia lipidov sa stanovila koncentrácia produktov reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (Babušíková et al., 2008).

Štatistická analýza

Získané údaje boli analyzované pomocou testu ANOVA a Studentovho t-testu a sú uvedené ako priemer \pm SEM – stredná chyba priemeru (Standard error of mean, S.E.M.). Za štatisticky významné výsledky sme považovali hodnoty štatistickej významnosti – p rovné a menšie ako 0,05.

Výsledky

Účinok veku na oxidačné poškodenie mozgu

Vplyv veku sme sledovali v membránovej frakcii mozgového homegenátu (tab. 1). Sledovala sa intenzita fluorescence dityrozínov. Stanovila sa koncentrácia tiolových skupín ako i koncentrácia produktov reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS). U senescentných zvierat sme pozorovali vyššie množstvo dityrozínov oproti dospelým zvieratám ($p < 0,01$). Koncentrácia tiolových skupín bola u senescentných zvierat vyššia, ale zmena nebola štatisticky významná. Koncentrácia TBARS bola u senescentných zvierat nižšia ako u dospelých zvierat ($p < 0,01$).

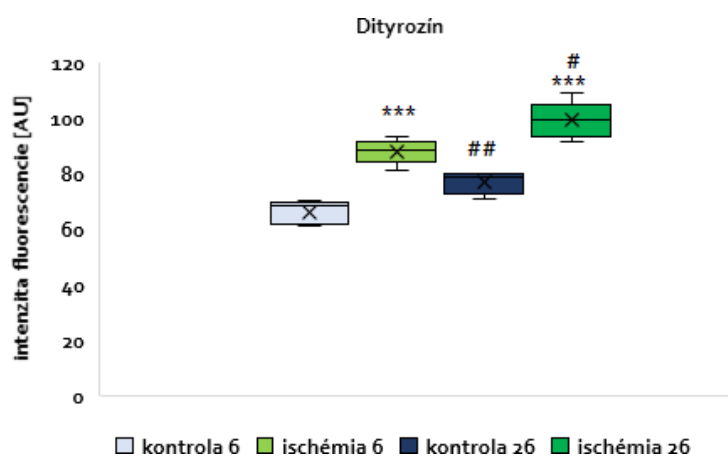
Tabuľka 1: Vplyv veku na množstvo dityrozínu, koncentráciu voľných tiolových skupín a TBARS v membránovej frakcii mozgu.

vek	dityrozín [AU]	voľné -SH mmol/g bielkoviny	skupinyTBARS nmol/mg
6 mesiacov	66,578 \pm 3,22	1,093 \pm 0,037	3,768 \pm 0,34
26 mesiacov	76,620 \pm 1,06**	1,172 \pm 0,036	3,142 \pm 0,17**

-SH – voľné tiolové skupiny, TBARS – produkty reakcie s kyselinou tiobarbiturovou. Hodnoty sú uvedené ako priemer \pm S.E.M. z piatich experimentov. ** $p < 0,01$ v porovnaní k 6 mesačným zvieratám.

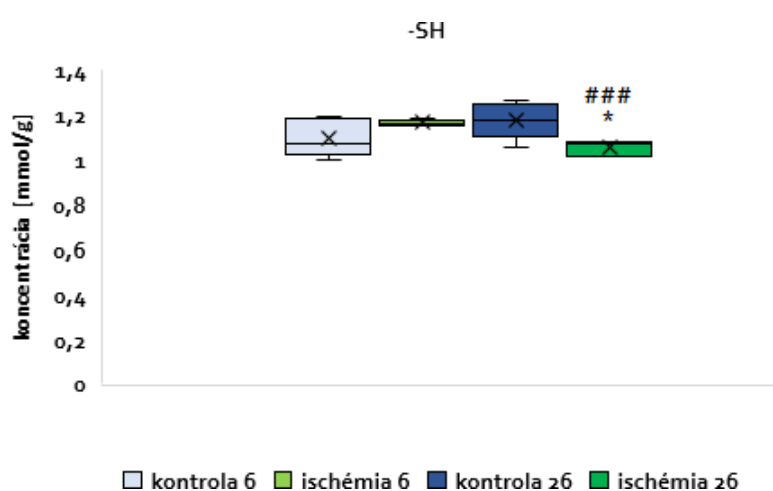
Vplyv ischémie na sledované parametre oxidačného poškodenia je znázornený na obrázkoch 1, 2 a 3. Indukovaná ischémia u zvierat mala za následok štatisticky významné oxidačné poškodenie u parametrov, ktoré sme sledovali. Intenzita fluorescence dityrozínu sa zvýšila u dospelých o $33 \pm 2,93$ % ($p < 0,001$) ako i senescentných o $29,1 \pm 3,83$ ($p < 0,001$) zvierat po 2 hodinovej ischémii (obr

1). Oxidačné poškodenie u senescentných zvierat tak v kontrolnej skupine ($15,9 \pm 2,63$ %) ako i v skupine zvierat po ischémii bolo vyššie ako u dospelých zvierat ($12,5 \pm 3,34$ %) (obr 1).



Obrázok 1: Vplyv ischémie na množstvo dityrozínu v membránovej frakcii mozgu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z piatich experimentov. *** $p < 0,01$ porovnané oproti kontrole v danom veku; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, porovnané oproti 6 mečaným zvieratám (kontrola verus kontrola, ischémia verus ischémia).

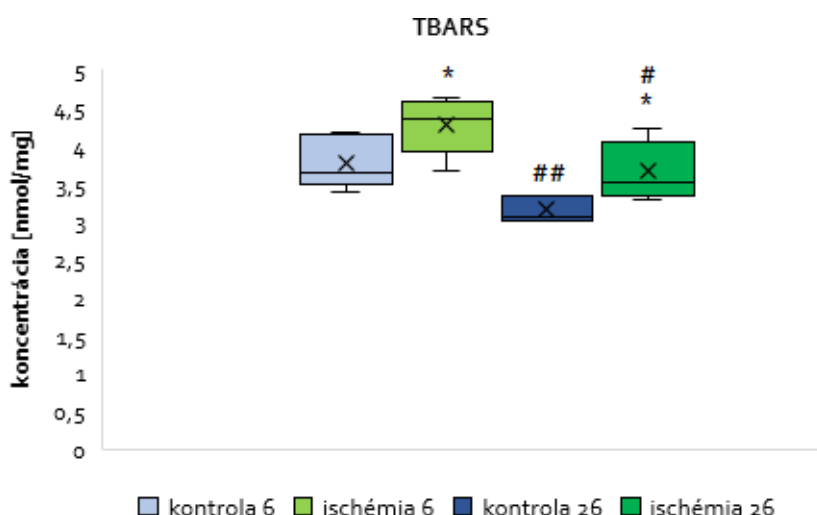
Zmena koncentrácie tiolových skupín následkom ischémie sa nepozorovala u dospelých zvierat (obr 2). Ischémia však mala negatívne dopad na koncentráciu tiolových skupín u senescentných zvierat, kde sa pozoroval pokles o $10,4 \pm 1,19$ % ($p < 0,05$). V skupine senescentných zvierat po ischémii bol pokles koncentrácie tiolových skupín o $9,6 \pm 1,20$ % ($p < 0,001$) oproti ischemickej skupine dospelých zvierat.



Obrázok 2: Vplyv ischémie na koncentráciu voľných tiolových skupín v membránovej frakcii mozgu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z piatich experimentov. * $p < 0,05$ porovnané oproti

kontrole v danom veku; ### $p < 0,001$, porovnané oproti 6 mečaným zvieratám (kontrola verzus kontrola, ischémia verzus ischémia).

Markerom, ktorý sa využíva na sledovanie peroxidácie lipidov je stanovenie produktov reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS). Koncentrácia TBARS sa počas experimentálne vyvolanej ischémie zvýšila u dospelých ako i senescentných zvierat (obr 3). Počas ischémie vzrástla koncentrácia TBARS u dospelých zvierat o $12,90 \pm 9,82 \%$ ($p < 0,05$) a u senescentných zvierat o $16,3 \pm 12,09 \%$ ($p < 0,05$).



Obrázok 3: Vplyv ischémie na koncentráciu TBARS v membránovej frakcii mozgu. TBARS – produkty reakcie s kyselinou tiobarbiturovou. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z piatich experimentov. * $p < 0,05$ porovnané oproti kontrole v danom veku; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, porovnané oproti 6 mečaným zvieratám (kontrola verzus kontrola, ischémia verzus ischémia).

Diskusia

Vďaka vedeckému pokroku a neustálemu zlepšovaniu poznania biochemických a biologických procesov v ľudskom organizme sa neustále predlžuje vek človeka. Na druhej strane so stúpajúcim vekom dochádza k akumulácii rôznych škodlivých zmien v organizme. Tieto zmeny spôsobujú stratu bunkových funkcií, ktoré predstavujú hlavný rizikový faktor pre s vekom súvisiace ochorenia. Starnutie má dopad na zvýšenú citlivosť na zvýšenie citlivosti k neurodegeneratívnym ochoreniam, vrátane zvýšenej náchylnosti na ischémiu a kognitívne zmeny aj u zdravého človeka. Molekulárne mechanizmy, ktoré sú zodpovedné za možné prepojenie medzi starnutím a ischémiou, starnutím a Alzheimerovou chorobou, ischémiou a Alzheimerovou chorobou nie sú dnes človeku stále známe. Vedecká literatúra je za ostatných 20 rokov plná tvrdení, že reaktívne formy kyslíka významnou mierou participujú na vzniku a rozvoji rôznych ochorení ako i na samotnom starnutí (Ionescu-Tucker and Cotman, 2021, Luo et al., 2020).

V našej štúdii sme sledovali účinok starnutia ako i ischemického poškodenia na oxidačné poškodenie bielkovín: vznik dityrozínu, obsah tiolových skupín a lipidov: produkty reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS). Počas starnutia sme pozorovali zvýšenú koncentráciu dityrozínu v homogenáte mozgu (membránová frakcia) a pokles koncentrácie TBARS. Štúdie vplyvu starnutia na peroxidáciu lipidov poskytujú rozporuplné výsledky. Zvýšená peroxidácia lipidov, kvantifikovaná stanovením reaktívnych produktov reakcie s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS), bola pozorovaná v starnúcom mozgu rôznych zvierat vrátane potkanov (Head et al., 2002; Nawarro a Boveris, 2004). Naopak, niektoré iné štúdie využívajúce rovnaké metódy nepreukázali nárast peroxidácie lipidov (Tian et al., 1998; Cini and Morreti, 1995). Výsledky našej štúdie naznačujú, že starnutie je spojené s akumuláciou fluorescenčných produktov v mozgu. Peroxidácia lipidov, modifikácia bielkovín sprostredkovaná peroxidáciou lipidov a s vekom súvisiaci oxidačný stres by mohli viesť priamo k oxidácii bielkovín.

Ischemické poškodenie indukované in vivo malo za následok oxidačné poškodenie bielkovín u starých i senescentných zvierat. Pozorovali sme nárast fluorescence dityrozínu v oboch vekových skupinách a pokles koncentrácie tiolových skupín u senescentných zvierat. Taktiež sme pozorovali štatisticky významný efekt ischemie u dospelých i senescentných zvierat v prípade zníženej koncentrácie TBARS. Oxidačné poškodenie u senescentných zvierat bolo väčšie ako u dospelých zvierat, čo môže naznačovať, že staršie zvieratá reagujú horšie na ischemiu. Naše výsledky sú v zhode s výsledkami získanými na podobných zvieracích modeloch (Balazs and Leon, 1994; Lovell et al., 1995; Murin et al., 2001)

Počas starnutia a ischemie sme zaznamenali oxidačné poškodenie bielkovín a lipidov, ktoré mohlo vzniknúť v dôsledku zvýšeného oxidačného stresu. Oxidačné poškodenie je spôsobené nadmernou tvorbou reaktívnych foriem kyslíka a nedostatočnou antioxidačnou ochranou. Hlbšie porozumenie procesom starnutia a ischemického poškodenia nám môže následne napomôcť pri diagnostike, ako i pri vypracovaní nových preventívnych a terapeutických prístupov.

Použitá literatúra

Antignano A, Liu Y, Offermann N, et al. Aging microglia. *Cell Mol Life Sci.* 2023 Apr 21; 80(5):126
Babusikova E, Jesenak M, Racay P, et al. Oxidative alternations in rat heart homogenate and mitochondria during ageing. *Gen Physiol Biophys.* 2008 Jun; 27(2):115-120
Balazs L and Leon M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochemical Research.* 1994 Sept 19; 19: 1131-1137
Cini, M and Moretti A Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* Jan-Feb; 16(1):53-57

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sept; 22(9):391-397

Fukagawa NK, Timblin CR, Buder-Hoffman S, et al. Strategies for evaluation of signaling pathways and transcription factors altered in aging. *Antioxid Redox Signal.* 2000 Fall; 2(3):379-389

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956;11, 298-300

Head E, Liu, J, Hagen TM et al. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J. Neurochem.* 2002 Jul; 82(2): 375-381

Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994, 233: 380-385

Ionescu-Tucker A and Cotman CW. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2021 Nov; 107:86-95

Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem.* 2000;35:1-62

Kozler P. Experimentální in vivo modely ischemie mozku. 2002 Čs. Fyziol. 51, 61-68

Lehotský J, Murín R, Strapková A, et al. Time course of ischemia/reperfusion-induced oxidative modification of neural protein in rat forebrain. *Gen Physiol Biophys.* 2004;23:401-4015

Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, et al. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1995 Aug; 45(8):1594-1601

Luo J, Mills K, le Cessie S, et al. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Res Rev.* 2020 Jan; 57:100982

Murín R, Drgová A, Kaplán P, et al. Ischemia/reperfusion-induced oxidative stress causes structural changes of brain membrane proteins and lipids. *Gen Physiol Biophys.* 2001 Dec; 20(4): 431-438

Navarro A and Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Nov; 287(5): R1244-1249

Pulsinelli WA and Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke.* 1988 Jul; 19(7):913-914

Racay P, Kaplan P, Lehotsky J. Ischemia-induced inhibition of active calcium transport into gerbil brain microsomes: effect of anaesthetics and models of ischemia. *Neurochem Research.* 2000 Feb; 25:285-292

Semsei I. On the nature of aging. *Mech Ageing Dev.* 2000 Aug;117(1-3):93-108

Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, et al. The lifetime risk of stroke. 2006 Feb; 37(2):345-350

Sies H and Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul;21(7):363-383

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985 Oct; 150(1):76-85

Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. Free Radic Biol Med. 1998 Jun; 24(9): 1477-1484

Fajčenie a funkcia endotelu v mladom veku

Mažgútová N.^{1,2}, Lazarová Z.¹, Stančík M.³, Grendár M.⁴, Javorka M.¹

¹Ústav fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

²Martinské centrum pre biomedicínu JLF UK, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

³Interná klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

⁴Laboratórium bioinformatiky a bioštatistiky, Biomedicínske centrum Martin,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Fajčenie tabaku je jedným z hlavných rizikových faktorov prispievajúcich ku vzniku a rozvoju viacerých kardiovaskulárnych ochorení (KVO). Napriek tomu, že vzťah medzi fajčením a KVO je zrejmý a preukázaný, presný a úplný patomechanizmus stojaci za týmto prepojením zatiaľ zostáva neobjasnený. Fajčenie vplyva na všetky fázy (od štádia dysfunkcie endotelu (ED) až po akútne komplikácie) procesu vzniku a rozvoja aterosklerózy (aterogenézy) ako jedného z hlavných mechanizmov vzniku KVO súvisiacich s fajčením. ED predstavuje dôležité predklinické reverzibilné štádium aterosklerotického procesu, ktoré sa môže vyvíjať už v prvých dvoch dekádach života. Adolescencia a mladý dospelý vek je veľmi dôležité obdobie z hľadiska vývoja fajčiarskeho návyku a jeho následkov na zdravie jedinca.

Cieľom tejto štúdie bolo – po objektivizácii fajčiarskeho statusu u zdravých adolescentov a mladých dospelých probandov pomocou dotazníkov a stanovenia hladiny kotinínu v plazme – vyšetrenie stavu endotelu prostredníctvom indexu reaktívnej hyperémie (RHI) s využitím neinvazívnej metódy na stanovenie funkcie endotelu ciev (metóda RH-PAT).

Do štúdie bolo zaradených 148 probandov, z toho 59 mužov a 89 žien, vo veku $18,7 \pm 2,7$ rokov (rozpätie 13 – 26 rokov), ktorí podstúpili vyšetrenie EndoPAT prístrojom za štandardizovaných podmienok. Fajčiarsky status bol určený na základe odpovedí z dotazníka a následne objektivizovaný pomocou hladiny plazmatického kotinínu s hraničnou hodnotou 15 ng/ml.

V našej štúdii sme nepreukázali štatisticky významný rozdiel vo funkcii endotelu – reprezentovanou RHI – medzi mladými zdravými fajčiarmi a nefajčiarmi ($p > 0,05$), a to ani po objektivizácii ich fajčiarskeho statusu pomocou kotinínu.

Táto štúdia môže byť základom pre budúci výskum, predovšetkým na väčšej vzorke fajčiarov, prípadne jedincov s pridruženými komorbiditami (napr. obezita), kde predpokladáme vzájomnú potenciáciu rizikových faktorov na rozvoji ED.

Kľúčové slová: fajčenie, endotel, dysfunkcia, kotinín

Úvod

Fajčenie tabaku je hlavný preventabilný rizikový faktor, ktorý vedie k rozvoju a progresii rôznych chronických porúch (Hameed a Malik 2024). Epidemiologické štúdie dokazujú existenciu vzťahu aj medzi fajčením a KVO (Okorare a kol., 2023). Za iniciáciu a progresiu KVO nie je zodpovedný len jeden patomechanizmus alebo určitá skupina látok cigaretového dymu, ale ide o celý komplex mechanizmov, ku ktorým sa pridáva genetické pozadie jedinca a vonkajší vplyv prostredia (Liu a kol., 2021).

Z predchádzajúcich štúdií je známe, že fajčenie je asociované s nárastom zápalovej reakcie a s chronicky zvýšenou zápalovou odpoveďou v porovnaní s nefajčiarmi, ktorá vplyva na všetky fázy procesu aterogenézy – od iniciálneho štádia tvorby aterosklerotického plátu, endotelovej dysfunkcie (ED) – až po akútne komplikácie (Kondo a kol., 2019). Tieto stavy potvrdzujú markery akútneho zápalu, ale aj zvýšené množstvo leukocytov v krvi. Počet leukocytov sa zvyšuje s vyššou závažnosťou fajčenia charakterizovanou množstvom vyfajčených cigariet aj hĺbkou inhalácie. To naznačuje, že fajčenie spôsobuje trvalú a dlhodobú zápalovú reakciu (Ugur a kol., 2018).

Spočiatku sú účinky cigaretového dymu na endotelové bunky len funkčné, spôsobené nedostatkom biologicky dostupného oxidu dusnatého (NO) a hemostatickou nerovnováhou. Pri chronickej expozícii však vykazuje vrstva endotelových buniek aj štrukturálne poškodenie a môže byť dokonca až úplne zdeštruovaná (Csordas a Bernhard, 2013).

Z časového hľadiska je možné vplyv fajčenia na funkciu endotelu rozdeliť na akútny a chronický. Akútny efekt je v rámci štúdií opisovaný po vyfajčení zvyčajne jednej cigarety pred samotným meraním. Vo všeobecnosti tieto štúdie dospeli k rovnakému záveru, že akútny efekt fajčenia sa odrazí v RHI (Hahad a kol., 2021). Dávnejšie prišiel so zaujímavým záverom Lekakis a kol. (1998), ktorý vo svojej práci predpokladá, že fajčenie spôsobuje akútnu ED, ktorá pretrváva aspoň 60 minút, čo vedie k predpokladu, že pravidelné fajčenie (napr. 1 cigareta/hodinu) môže byť asociované s ED počas celého dňa, a to aj bez trvalého poškodenia endotelu.

Včasné aterosklerotické zmeny u fajčiarov môžu byť detekované prostredníctvom viacerých neinvazívnych metód. Jednou z metód je už spomínané hodnotenie funkcie endotelu na základe indexu RHI pomocou prístroja EndoPAT. Nedávne štúdie sa zamerali na zistenie ED u mladých dospelých aktívnych, aj pasívnych fajčiarov. Ukázalo sa, že od endotelu závislá vazodilatácia je narušená u mladých fajčiarov a zhoršuje sa aj po akútnej expozícii cigaretovému dymu (Rodriguez-Portelles a Rodriguez-Leyva, 2019).

Adolescencia a mladý dospelý vek je veľmi dôležité obdobie z hľadiska vývoja fajčiarskeho návyku a jeho následkov na zdravie jedinca. O vzájomnom vzťahu medzi fajčením a jeho prepojením na ED a tým aj na KVO, predovšetkým v populácii mladých zdravých ľudí bez vplyvu ďalších komorbidít, existuje však iba veľmi málo informácií. Cieľom našej práce bolo preto vyšetriť stav endotelu v periférnej mikrocirkulácii a zhodnotiť jeho stav pomocou indexu RHI v súvislosti s fajčiarskym statusom. Štúdium týchto mechanizmov môže prispieť k rozšíreniu poznatkov a poskytnúť nový pohľad na mechanizmy uplatňujúce sa v iniciálnych štádiách aterosklerotického procesu u mladých fajčiarov.

Materiál a metodika

Vyšetrovaný súbor v našej štúdii tvorilo 148 probandov, z toho 89 dievčat a žien a 59 chlapcov a mužov s priemerným vekom $18,7 \pm 2,7$ rokov (rozpätie 13 – 26 rokov) s normálnou hodnotou body mass indexu (BMI) vzhľadom na vek. Kvôli štandardizácii podmienok bolo potrebné u vyšetrovaných osôb dodržať viaceré predpoklady. Vyšetrovaný proband musel byť zdravý, bez prítomnosti infekčných ochorení. Taktiež nesmel mať nádchu, zvýšenú teplotu alebo iné ochorenia respiračného systému a tráviaceho traktu počas jedného týždňa pred vyšetrením. Dievčatá boli vyšetrené iba v rozmedzí 5. – 12. dňa menštruačného cyklu. Deň pred vyšetrením bolo vyšetrovaným zakázané konzumovať alkoholické a kofeínové nápoje.

Vyšetrenie funkcie endotelu ciev stanovením RHI indexu metódou RH-PAT sme uskutočnili pomocou prístroja EndoPAT 2000 (Itamar Medical Ltd, Caesarea, Israel). EndoPAT systém je založený na neinvazívnej technológii merania amplitúdy pulzovej vlny od úderu k úderu srdca, ktorá odráža objemové zmeny končekov prstov rúk súvisiace so zmenami prietoku krvi v cievach. Manžeta so senzorom tvaru náprstka zabezpečuje rovnomerné tlakové pole na distálne dve tretiny prsta. Práve rovnomerná aplikácia subdiastolického tlaku na konček prsta je pri vyšetrení dôležitá, pretože okrem zamedzenia hromadenia krvi odľahčuje arteriálnu stenu a tak jej dáva možnosť väčších dynamických zmien merateľných senzorom (Moerland a kol., 2012).

Počas vyšetrovania našich probandov sme prvých päť minút merania zaznamenávali signál z pletyzmografických sond bez oklúzie a. brachialis. Počas nasledujúcich 5 minút sa manžeta na jednom ramene nafúkla, čím sa uzavrel prietok krvi v hornej končatine. Posledných 5 minút sa snímal signál po uvoľnení manžety. Obnovenie prietoku krvi obvykle vyvolalo vazodilatáciu (reaktívna hyperémia). Tieto zmeny boli zachytené ako zvýšenie amplitúdy signálu periférnej artériálnej tonometrie – PAT (z angl. „peripheral arterial tonometry“). Následne software vypočítal pomer prietoku krvi pred a po uzatvorení ciev (hodnotu RHI), ktorý poskytuje informáciu o funkcii endotelu. Informácia o zmene prietoku v kontralaterálnej končatine bola použitá na sledovanie iných vazomotorických zmien, ktoré bolo potrebné zohľadniť pri určení RHI. Normálnym výsledkom

vyšetrenia pomocou EndoPAT vyšetrenia je nárast prekrvenia končatiny po oklúzii nad hodnoty na kontralaterálnej končatine spojený so stimuláciou tvorby a uvoľňovania NO v zdravom intaktnom endoteli (hodnota RHI > 1,61). Z metodických prác vyplýva, že až 60% cievnych reakcií bolo v tejto oblasti sprostredkované NO (Nohria a kol., 2006).

Zo vzoriek plazmy sme analyzovali prítomnosť kotinínu pomocou špecifického kitu – Cotinine ELISA Kit (Abnova, Taiwan). K dispozícii sme mali 113 vzoriek plazmy (od 50 mužov a 63 žien). Za hraničnú hodnotu diferencujúcu fajčiarov od nefajčiarov sme na základe literárnej rešerše zvolili tradične používanú hodnotu 15 ng/mL.

Na záver boli probandi požiadaní o vyplnenie dotazníka o fajčení subjektívne určujúcim fajčiarsky status. Pre pojem fajčiar/nefajčiar (Bottom, 2009) sme použili nasledovné definície a ich vzájomnú kombináciu, podľa ktorej sme rozdelili probandov:

1. kritérium (pracovný názov F100): za fajčiara bol považovaný jedinec, ktorý vyfajčil 100 a viac cigariet v priebehu svojho života (Bottom a kol., 2009),
2. kritérium (pracovný názov F30): za fajčiara bol považovaný jedinec, ktorý vyfajčil aspoň jednu cigaretu v priebehu posledných 30 dní (Bottom a kol., 2009),

Okrem týchto kritérií bolo použité aj 3. kritérium (pracovný názov F_{kot}), pri ktorom bol za fajčiara považovaný jedinec, u ktorého bola zistená zvýšená hladina kotinínu v plazme (Kim, 2016).

Štatistická analýza

Všetky získané údaje – RHI, hladiny kotinínu a fajčiarsky status boli vzájomne analyzované pomocou štatistického softvéru SYSTAT 13 (Systat software Inc., CA, USA). Vzhľadom k negaussovskej distribúcii väčšiny hodnotených premenných sme na štatistickú analýzu – medziskupinové porovnanie (fajčiari vs nefajčiari) – použili neparametrický Mann-Whitneyho U Test.

Výsledky

Skupinu 138 probandov sme na základe vopred zvolených kritérií F100 a F30 rozdelili na fajčiarov a nefajčiarov. Na základe kritérií F30, F100 a F30+F100 (probandi súčasne spĺňajúci kritéria F30 a F100) jednotlivé skupiny tvorilo 61, 46 a 31 fajčiarov. Následne sme hľadali súvislosti s indexom RHI. Tab. 1 ukazuje, že ani v jednom prípade sa nám nepodarilo pozorovať signifikantné rozdiely medzi skupinami v RHI.

Tabuľka 1: Počet fajčiarov/nefajčiarov podľa zvolených kritérií F₃₀, F₁₀₀, ich kombinácie a kritéria F_{kot} a porovnanie hodnôt RHI medzi skupinami

Kritérium	Počet FAJČIAROV	RHI fajčiarov		Počet NEFAJČIAROV	RHI nefajčiarov		p-hodnota
		Mean	± SD		Mean	± SD	
F ₁₀₀	46	1,64	0,50	102	1,61	0,50	0,748
F ₃₀	61	1,73	0,64	87	1,57	0,42	0,618
F ₁₀₀ + F ₃₀	31	1,55	0,34	117	1,63	0,52	0,852
F _{kot}	32	1,55	0,45	81	1,68	0,58	0,601

Za hladinu významnosti sme považovali $p < 0,05$. Skratky sú vysvetlené v texte.

V rámci tejto skupiny sme získali hladiny kotinínu od 113 probandov (50 mužov a 63 žien). Za hraničnú hodnotu kotinínu v plazme sme si na základe predchádzajúcich štúdií stanovili hodnotu 15 ng/mL (Kim a kol., 2016). Túto hodnotu sme použili na rozdelenie fajčiarov od nefajčiarov; vyčlenili sme 81 nefajčiarov (plazmatická hladina kotinínu v rozmedzí 1,6 – 5,7 ng/mL; priemer $2,0 \pm 0,9$ ng/mL) a 32 fajčiarov (plazmatická hladina kotinínu v rozmedzí 54,0 – 299,5 ng/mL; priemer $153 \pm 66,7$ ng/mL).

Pri medziskupinovom porovnaní RHI (fajčiari určení podľa kritéria F_{kot}) sme takisto nezistili signifikantný rozdiel ($p = 0,601$). Tento vzťah nebol zistený ani po rozdelení súboru podľa pohlavia (u mužov sa ukázal sklon k nižším hodnotám ($p = 0,069$), rozdiel však nedosiahol štatistickú významnosť; u žien $p = 0,410$).

Diskusia

Táto pilotná štúdia bola zameraná na sledovanie vzťahu medzi fajčením a funkciou endotelu u zdravých probandov v adolescentnom veku a mladých dospelých ľudí, nakoľko v mladej populácii bez iných kardiovaskulárnych rizikových faktorov je len veľmi málo informácií o včasných zmenách v súvislosti s aterosklerózou. Hlavným výsledkom tejto štúdie je, že sme nezistili štatisticky významný rozdiel vo funkcii endotelu – reprezentovanou RHI, ani po objektivizácii fajčiarskeho statusu pomocou kotinínu.

Našu skupinu probandov tvorili výhradne mladí zdraví adolescenti a mladí dospelí ľudia bez komorbidít a chronickej medikácie. V rámci iných prác hodnotiacich stav funkcie endotelu bol u adolescentov preukázaný vzťah medzi zhoršenou funkciou endotelu a diabetes mellitus typu 1 (Mahmud a kol., 2008), obezitou (Pareyn a kol., 2015), obezitou spojenou s inzulínovou rezistenciou (Mahmud a kol., 2009) a inými rizikovými faktormi ED. Otázkou zostáva, či fajčenie, vystupujúce

v našej práci ako samotný rizikový faktor, je dostatočne schopné vyvolať významnú ED už v tak mladom veku aj bez pridružených rizikových faktorov. Autori Hamburg a kol. (2008) potvrdili, že zhoršenie RHI je spojené s klasickými a metabolickými faktormi KVO. Predpokladáme teda vzájomnú spoluprácu týchto faktorov na rozvoji ED aj u dospelých. Tento fakt by bolo však potrebné overiť aj na skupine fajčiarov v adolescentnom veku s pridruženou komorbiditou (napr. obezitou).

Z časového hľadiska môžeme vplyv fajčenia na funkciu endotelu rozdeliť na akútny a chronický. Za akútny efekt fajčenia sa považuje vyfajčenie jednej cigarety krátko pred vyšetrením funkcie endotelu pomocou na ultrasonografii založenej metóde „flow-mediated dilation“ (FMD) alebo meraní funkcie endotelu pomocou RH-PAT technológie. Ukázalo sa, že akútny efekt fajčenia na funkciu endotelu sa odrazí v zhoršenej RHI (Taha a kol., 2013) alebo FMD (Lekakis a kol., 1998). V štúdiách Taha a kol. (2013) a Karatzi a kol., (2007) sa preukázalo, že zníženie RHI pretrvávalo u mladých fajčiarov aj po 30 minútach a po jednej hodine po vyfajčení cigarety (u nefajčiarov tento efekt vymizol po 30 minútach). U EndoPAT metódy nebolo pozorované zhoršenie RHI po 30 minútach od fajčenia (BO' a kol., 2014). V inej práci pozorovali zhoršenie FMD aj po 60 minútach u nefajčiarov, čo naznačuje, že fajčenie spôsobuje akútnu ED s trvaním najmenej 60 minút a zároveň vedie k predpokladu, že pravidelné fajčenie (napr. 1 cigareta každú hodinu) môže byť asociované s ED počas celého dňa, a to aj bez permanentného poškodenia endotelu (Lekakis a kol., 1998). Je pravdepodobné, že až po mnohonásobnom pôsobení „akútnych efektov“ sa môže objaviť pretrvávajúce poškodenie endotelu, ktoré predisponuje k aterosklerotickému procesu.

Naše výsledky nepreukázali štatisticky významný rozdiel vo funkcii endotelu medzi fajčiarmi a nefajčiarmi. Toto zistenie môže potvrdzovať fakt, že vplyv fajčenia na funkciu endotelu je v tomto veku reverzibilný a nespôsobuje ešte trvalejšie poškodenie endotelu, ktoré by sme mohli detekovať. V budúcnosti by bolo vhodné zaradiť sledovanie, od akého trvania expozície fajčeniu je možné detekovať chronické poškodenie endotelu a faktory (frekvencia, množstvo vyfajčených cigariet), ktoré by sa na poškodení endotelu mohli podieľať. Okrem toho by bolo vhodné zaradiť do merania aj akútny efekt fajčenia na funkciu endotelu u adolescentov a mladých dospelých probandov, čím by sa overila jeho schopnosť vyvolať poškodenie endotelu. Vzhľadom na metodiku tejto štúdie a kritérium, že probandi boli požiadaní, aby pred vyšetrením nefajčili, bola naša práca zameraná na chronický vplyv fajčenia na funkciu endotelu.

Chronický vplyv fajčenia na endotelovú funkciu nie je jednoznačný. Predpokladá sa, že chronické fajčenie môže byť spojené s pretrvávajúcim poškodením endotelu, ktoré môže viesť k akcelerácii aterosklerotického procesu (Hahad a kol., 2023). Experimentálna štúdia (Lenasi, 2005) však ukázala, že ani 30-dňová subchronická expozícia hlavnému prúdu cigaretového dymu nespôsobuje detekovateľné zmeny vo funkcii endotelu u potkanov.

V našej práci sme na základe predchádzajúcich štúdií objektivizovali fajčiarsky status pomocou cirkulujúcich hladín kotinínu (Caraballo a kol., 2004; Vartiainen a kol., 2016). Zaujímavé sú pozorované rozdiely v zastúpení fajčiarov v hodnotenom súbore v závislosti od metódy určenia fajčiarskeho statusu, čo podčiarkuje potrebu objektívneho hodnotenia fajčiarskeho statusu v ďalších štúdiách.

V tejto štúdii sme sa venovali klasickej forme fajčenia – cigaretám, ktoré stále ešte tvoria veľmi významný podiel továrensky vyrábaných tabakových výrobkov na svete. Zdravotné riziko spojené s fajčením je však porovnateľné aj u iných foriem (cigary, šúľané cigarety, vodná fajka, rozpustný a bezdymový tabak), ktoré sú v niektorých krajinách uprednostňované pred cigaretami (Baška a Katreniaková, 2010; WHO, 2015). V posledných rokoch sa k nim pripájajú aj elektronické cigarety. Hoci predstavujú pre fajčiara menšie riziko v porovnaní s klasickými cigaretami, vzhľadom na viaceré zdravie škodlivé látky v nich obsiahnuté ich nemožno považovať za neškodnú alternatívu. Okrem toho, vzhľadom na to, že ide o nový fenomén, nie sú ešte dostatočne známe neskoré následky ich dlhodobého užívania (Glantz a Bareham, 2018). Výsledky prieskumov Global Youth Tobacco Survey poukazujú na relatívny nárast významu užívania iných ako klasických foriem užívania tabaku (napr. elektronických cigariet). Týmto formám fajčenia treba venovať adekvátnu pozornosť, pretože môžu zohrávať významnú úlohu pri vytváraní fajčiarskeho návyku a následnom rozvoji a progresii aterosklerotického procesu, podobne ako klasická forma fajčenia cigariet, ktorej sme sa venovali v našej štúdii.

Doposiaľ nám nie je známa skutočnosť o dostupnosti prác zaoberajúcich sa danou problematikou s podobným metodickým nastavením štúdie. Bolo by vhodné doladiť metodické postupy do budúcnosti a predovšetkým zrealizovať sledovanie na väčšom súbore probandov, hlavne fajčiarov, nakoľko náš súbor tvorili prevažne nefajčiari. Poukázali sme aj na možnosť objektivizácie fajčiarskeho statusu na základe biomarkera – kotinínu, pričom uplatnenie tohto postupu by mohlo byť využité nielen v klinických, ale aj epidemiologických štúdiách na získanie „skutočných“ hodnôt prevalencie fajčenia v našej populácii – najmä u adolescentov.

Použitá literatúra

Baška T., Katreniaková Z. Základy prevencie užívania tabaku. Martin: Jesseniova lekárska fakulta v Martine, 2010. ISBN 978-80-88866-89-3.

BO' C. D. et al. Acute cigarette smoking impairs microvascular function in young moderate smokers: A potential model for studying vasoactive properties of food bioactives. *PharmaNutrition*. 2014, 2(1) 1-7.

Bottom T. a kol. Youth smoking status: perceptions versus measurements. *Am. J. Health Behav.*, 2009, 33(6): 760-768.

Caraballo R., Giovino G., Pechacek T. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine & Tobacco Research*. 2004, 6(1): 19-25.

Csordas A., Bernhard D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. In: *Nat Rev Cardiol*. [online]. 2013, 10(4): 219-230.

Glantz S.A., Bareham D.W. E-Cigarettes: Use, Effects on Smoking, Risks, and Policy Implications. *Annu Rev Public Health*. 2018, 39: 215-35.

Hahad O., Arnold N., Prochaska J. H., Panova-Noeva M., Schulz A., Lackner K. J., Pfeiffer N., Schmidtmann I., Michal M., Beutel M., Wild P.S., Keaney J.F. Jr., Daiber A., Munzel, T. Cigarette smoking is related to endothelial dysfunction of resistance, but not conduit arteries in the general population-results from the gutenber health study. *Front Cardiovasc Med*. 2021, 8: 674622.

Hamburg N. M. et al. Cross-Sectional Relations of Digital Vascular Function to Cardiovascular Risk Factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008, 117(19): 2467-2474.

Hameed A., Malik D. Clinical study protocol on electronic cigarettes and nicotine pouches for smoking cessation in Pakistan: a randomized controlled trial. *Trials*. 2024, 25(1): 9.

Karatzis K. et al. Acute smoke-induced endothelial dysfunction is more prolonged in smokers than in non-smokers. *International J. of Cardiol*. 2007, 120(3): 404-406.

Kim S. Overview of Cotinine Cutoff Values for Smoking Status Classification. *Int. J. Enviro. Res. Public Health*, 2016, 13(12): 1661-7827.

Kondo T., Nakano Y., Adachi S., Murohara T. Effects of tobacco smoking on cardiovascular disease. *Circ J*. 2019, 83(10): 1980-5.

Lekakis J a kol. Effects of Acute Cigarette Smoking on Endothelium- Dependent Arterial Dilatation in Normal Subjects. *Am. J. Cardiol.*, 1998, 81(10): 1225-1228.

Lenasi H. Effect of subchronic exposure to mainstream cigarette smoke on endothelium-dependent vasodilation in rat arteries. *Zdrav Vest*. 2005, (74): 415-21.

Liu L., Shi Z., Ji X., Zhang W., Luan J., Zahr T., Qiang L. Adipokines, adiposity, and atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2022, 79(5): 272.

Mahmud F.H. a kol. Impaired Endothelial Function in Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Ped.*, 2008, 152(4): 557-562.

Mahmud F.H. et al. Impaired Vascular Function in Obese Adolescents with Insulin Resistance. *J. Ped.* 2009, 155(5): 678-682.

Moerland M., Kales A.J., Schrier L., van Dongen M.G., Bradnock D., Burggraaf J. Evaluation of the EndoPAT as a Tool to Assess Endothelial Function. *Int. J. Vasc. Med*. 2012, 2012: 904141.

Nohria A., Gerhard-Herman M., Creager M.A., Hurley S., Mitra D., Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of difital pulse volume amplitude in humans. *J. Appl. Physiol*. 2006, 101(2): 545-548.

Okorare O., Evbayekha E.O., Adabale O.K., Daniel E., Ubokudum D., Olusiji S.A., Antia A.U. Smoking

Cessation and Benefits to Cardiovascular Health: A Review of Literature. *Cureus*. 2023, 15(3): e35966.

Pareyn A., Allegaert K., Verhamme P., Vinckx J., Casteels K. Impaired endothelial function in adolescents with overweight or obesity measured by peripheral artery tonometry. *Pediatr Diabetes*. 2015, 16: 98-103.

Rodriguez-Portelles A., Rodriguez-Leyva D. Endothelial and left ventricular diastolic function in young adults exposed to tobacco. *Can. J. Physiol. Pharm.*, 2019, 97(10): 1006-1011.

Taha N.M. a kol. Acute effects of cigarette smoking in habitual smokers, a focus on endothelial function. *Egypt. Heart J*. 2013, 65(4): 275-279.

Ugur M.G., Kutlu R., Kilinc I. The effects of smoking on vascular endothelial growth factor and inflammation markers: A case-control study. *Clin Respir J*. 2018, 12(5): 1912-8.

Vartiainen E. Validation of self reported smoking by serum cotinine measurement in a community based study. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 2016, 56(3): 167-170.

WHO. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking. Geneva, World Health Organization, 2015.

Incidentálny nález sklerotizujúceho pneumocytómu

Tobiášová K.¹, Mičák J.¹, Huťka Z.¹, Kolenčíková P.¹, Dzian A.²

¹ Ústav patologickej anatómie, Univerzitná nemocnica Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

² Klinika hrudníkovej chirurgie, Univerzitná nemocnica Martin, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Sklerotizujúci pneumocytóm patrí medzi raritné benígne pľúcne lézie, ktorý svojím vzhľadom môže imitovať iné, závažnejšie diagnózy. Najmä v prípade peroperačnej biopsie môže byť diferenciálna diagnóza náročná. Doteraz publikované prípady popisujú aj nádory s malígnym biologickým potenciálom a mnohopočetné lézie, ktoré môžu klinicky imitovať metastatický rozsev. V nasledujúcej kazuistike popisujeme prípad 63-ročnej pacientky s náhodným nálezom pľúcneho tumoru benígneho vzhľadu, diagnostikovaného peroperačne a s využitím imunohistochemických metód. Jedným zo zaujímavých ukazovateľov bol aj proliferatívny faktor Ki67 s ojedinelými ložiskami neobvyklej cytoplazmatickej pozitivity.

Kľúčové slová: sklerotizujúci pneumocytóm, sklerotizujúci pľúcny hemangióm, peroperačná biopsia, proliferatívny index, Ki67

Úvod

Sklerotizujúci pneumocytóm, kedysi známy pod názvom sklerotizujúci pľúcny hemangióm, je zriedkavý pľúcny tumor so širokým vekovým výskytom častejšie u žien, s vrcholovou incidenciou v strednom veku. Prvý raz bol popísaný v roku 1965, pričom histomorfologický obraz neumožňoval bližšie zaradenie k epitelálnym, endotelálnym, resp. reaktívnym léziám vznikajúcim ako dôsledok reorganizácie krvnej zrazeniny (Liebow a Hubbell 1956). V najnovšej edícii SZO klasifikácie hrudných nádorov je však formálne radený medzi pľúcne adenómy (Beasley et al., n.d.). Klinická manifestácia je pomerne nevýrazná a nádor je často objavený incidentálne pri zobrazovacom vyšetrení, pričom nádor má spravidla vzhľad dobre ohraničenej masy. Môže obsahovať ložiská cystickej degenerácie, regresívnych zmien a kalcifikácie, v niektorých prípadoch dokonca môže vykazovať metabolickú aktivitu, ktorá klinického lekára vedie k podozreniu z malignity (Lizarraga Madrigal et al. 2023). Histologický obraz lézií je pomerne rôznorodý, no kľúčovou diagnostickou črtou je prítomnosť dvoch samostatných bunkových populácií. Centrálna je nádor zložený z okrúhlych stromálnych buniek s okrúhlymi jadrami, granulárnym chromatínom a nenápadnými jadierkami. Na povrchu ho lemujú nízke kubické bunky pripomínajúce pneumocyty II. typu. Tieto dve komponenty niekedy vytvárajú bohaté papiliformné proliferácie, ktoré môžu imitovať papilárne rastúci pľúcny adenokarcinóm.

Diagnóza je náročná najmä v prípade predominancie tohto vzoru v cytológii alebo peroperačnej biopsii (Shang et al. 2021) (Chan a Chan 2002).

V tejto kazuistike prezentujeme náhodný nález sklerotizujúceho pneumocytómu u 63-ročnej pacientky bez významnejšieho predchorobia, ktorý v diferenciálnej diagnóze nútil zvážiť karcinoid, iné neuroendokrinné tumory a reaktívne zmeny.

Prezentácia prípadu

63-ročná pacientka bez významnejších komorbidít mala pri zobrazovacom vyšetrení identifikovaný nález tumoru nejednoznačnej dignity, zhodnotený najpravdepodobnejšie ako benígny pľúcny hamartóm (Obrázok 1).

CT snímok realizovaný natívne a postkontrastne bol rádiológom popísaný ako tumor S1 veľkosti 24x17x18 mm, ostrých, mierne laločnatých kontúr, mierne nehomogénnej štruktúry, s drobným kalcifikátom, bez ďalších jednoznačných infiltratívnych zmien.

Pacientkin výkonnostný stav umožňoval realizáciu chirurgického výkonu s kompletnou resekciou ložiska súčasne s realizáciou peroperačnej histológie. Makroskopicky bol v polmesiačikovitom resekáte identifikovaný pás šedobelavej lézie hrúbky 2-4mm, dĺžky 13 mm, z ktorého bol zhotovený rýchly rez, hlásený hrudnému chirurgovi ako obraz nejednoznačných reaktívnych zmien s predominanciou obrazu porušenej mikrocirkulácie, na periférii s úzkym pásom nejednoznačne zaraditeľnej v.s. nádorovej populácie neurčenej histogenézy a dignity.

Po zhotovení definitívneho rezu a špeciálnych farbení bola v základnom HE reze identifikovaná nádorová populácia tvorená väčšími okrúhlymi pomerne monomorfnými bunkami bez nápadnejšej mitotickej aktivity, bez identifikovanej hlienotvorby, svojím vzhľadom imitujúca neuroendokrinnú neopláziu (Obrázok 2).

Imunohistochemicky tieto bunky boli pozitívne pri dôkaze TTF-1 a vimentínu pri súčasnej negativite CK5/6, CK7, synaptofyzínu a chromogranínu, s veľmi nízkou proliferáčnou aktivitou (do 5%), avšak ojedinele sa vyskytovali ložiská neobvyklej intracytoplazmatickej granulárnej positivity (Obrázok 3). Miestami bolo možné identifikovať na povrchu populáciu kubických buniek pripomínajúcich pneumonocyty fokálne s ložiskami svetlobunkovej premeny, ktoré exprimovali TTF-1, CK7 (Obrázok 4), fokálne aj CD56 a vimentín.

Po prvotnej úvahe nad diagnózou neuroendokrinnnej lézie, respektíve hyperplázie neuroendokrinných buniek, bolo v dôsledku negativity NE markerov potrebné rozšíriť diferenciálnu diagnózu. Prítomnosť dvoch komponent odlišného vzhľadu s pozitívnou expresiou TTF-1 napokon viedli k identifikácii lézie ako sklerotizujúci pneumonocytóm.

Diskusia

Sklerotizujúci pneumocytóm je neobvyklá lézia, ktorá nepatrí do bežného spektra diferenciálnej diagnózy počas peroperačnej histológie, pričom môže ľahko dôjsť k zámene za iné jednotky. Použitie IHC vyšetrení, ktoré lepšie vizualizujú dve rozdielne komponenty napokon vedie k správnej diagnóze. V našom prípade boli taktiež prítomné ložiská nezreteľnej intracytoplazmatickej positivity Ki67, ktoré boli popísané v prípade niekoľkých rôznych diagnóz, vrátane tohto nádoru (Kim et al. 2013).

Biologický potenciál sklerotizujúceho pneumonocytómu sa prevažne pohybuje v spektre benígnych lézií, avšak boli reportované aj prípady metastazujúce do regionálnych lymfatických uzlín a vzdialených orgánov. Riziko metastáz je najmä u mladších pacientov mužského pohlavia, pričom metastatické lézie obsahovali len stromálnu komponentu, bez nálezu kuboidálnych buniek, čo naznačuje, že horšie diferencovaná stromálna populácia sa môže správať agresívnejšie (Wang et al. 2023), dokonca už bol popísaný aj prípad s malignizáciou obidvoch zložiek (Teng a Teng 2019). V prípade mnohopočetných lézií taktiež hrozí riziko nesprávnej diagnózy sekundárnych pľúcnych metastáz (Ma et al. 2024) (Kawai et al. 2018) (Santamaria-Barria, Sceusi, a Antonoff 2017).

V rámci peroperačnej diagnózy pri absencii cytologických detailov je možné léziu pokladať za proliferáciu neuroendokrinných buniek, čo by v našom prípade viedlo k rozšíreniu chirurgického výkonu a zbytočnej redukcii pľúcnej kapacity. V prípade náhodného nálezu a periférnej lokalizácie je potrebné na túto diagnózu myslieť, najmä ak nález obsahuje reaktívne, hemorragické alebo sklerotizujúce zmeny.

Záver

Sklerotizujúci pneumocytóm je zriedkavá benígna lézia, ktorá však môže viesť k diagnostickým omylom a zámene za bežnejšie sa vyskytujúce nádory s vyšším malígnym potenciálom. Umiernené hodnotenie nejednoznačných nálezov pri peroperačnej biopsii umožňuje predísť nadmernému chirurgickému výkonu vedúcemu k permanentnému zníženiu pľúcnej kapacity u pacienta.

Pacientka je toho času bez ďalšieho klinického sledovania a bez známosti bližších klinických údajov.

Použitá literatúra

Beasley, Mary Beth, Fernando Augusto Soares, Teh-Ying Chou, a En-Hua Wang. n.d. "Sclerosing Pneumocytoma". V WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours. 5th Edition. International Agency for Research on Cancer. <https://publications.iarc.fr/595>.

Chan, A C L, a J K C Chan. 2002. "Can Pulmonary Sclerosing Haemangioma Be Accurately Diagnosed by Intra-operative Frozen Section?" Histopathology 41 (5): 392–403. <https://doi.org/10.1046/j.1365>

2559.2002.01461.x.

Kawai, Hitomi, Norio Takayashiki, Haruo Otani, Shingo Sakashita, a Masayuki Noguchi. 2018. "A Case of Microscopic, Multiple Sclerosing Pneumocytoma". *Pathology International* 68 (3): 196–201. <https://doi.org/10.1111/pin.12648>.

Kim, Baek-hui, Yoon-sung Bae, Se Hoon Kim, Hyeong-jae Jeong, Soon Won Hong, a Sun Och Yoon. 2013. "Usefulness of Ki-67 (MIB-1) immunostaining in the diagnosis of pulmonary sclerosing hemangiomas". *APMIS* 121 (2): 105–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02945.x>.

Liebow, Averill A., a David S. Hubbell. 1956. "Sclerosing Hemangioma (Histiocytoma, Xanthoma) of the Lung". *Cancer* 9 (1): 53–75. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195601/02\)9:1<53::AID-CNCR2820090104>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195601/02)9:1<53::AID-CNCR2820090104>3.0.CO;2-U).

Lizarraga Madrigal, Daniella, Manuel Cabrera Charleston, Asad Khan, George Eapen, Neda Kalhor, Qiong Gan, a Horiana Grosu. 2023. "Pulmonary Sclerosing Pneumocytomas Mimicking Lung Cancer". *Cureus*, april. <https://doi.org/10.7759/cureus.37395>.

Ma, Tuo, Weiwei Tian, Jingmian Zhang, a Xinming Zhao. 2024. "Multiple Pulmonary Sclerosing Pneumocytomas Mimicking Lung Metastasis on 18F-FDG PET/CT: A Rare Case". *Asian Journal of Surgery* 47 (11): 4836–38. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2024.05.153>.

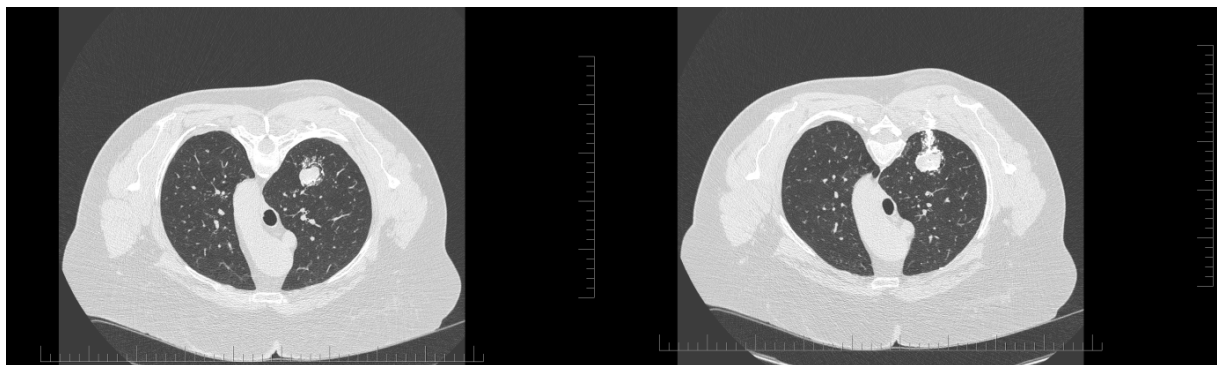
Santamaria-Barria, Juan A., Eric L. Sceusi, a Mara B. Antonoff. 2017. "Bilateral Pulmonary Pneumocytomas". *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 29 (4): 558–60. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2017.05.014>.

Shang, Zhanxian, Yuchen Han, Jinchen Shao, Lei Zhu, Haohua Teng, a Jie Zhang. 2021. "Challenging of Frozen Diagnoses of Small Sclerosing Pneumocytoma". *Journal of Clinical Pathology* 74 (11): 730 34. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206729>.

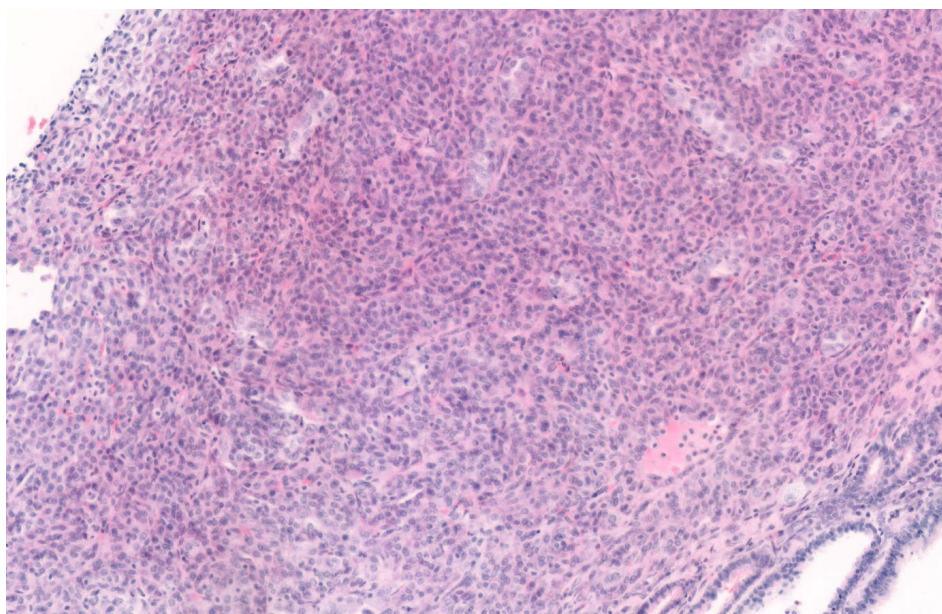
Teng, Xiao, a Xiaodong Teng. 2019. "First report of pulmonary sclerosing pneumocytoma with malignant transformation in both cuboidal surface cells and stromal round cells: a case report". *BMC Cancer* 19 (1): 1154. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6356-z>.

Wang, Xingen, Chi-Sing Ng, Xiaoxin Shi, a Weihua Yin. 2023. "Characteristics of Metastatic and Nonmetastatic Pulmonary Sclerosing Pneumocytomas: A Clinicopathological Study of 68 Cases and 15 Reported Metastatic Cases". *Laboratory Investigation* 103 (7): 100135. <https://doi.org/10.1016/j.labinv.2023.100135>.

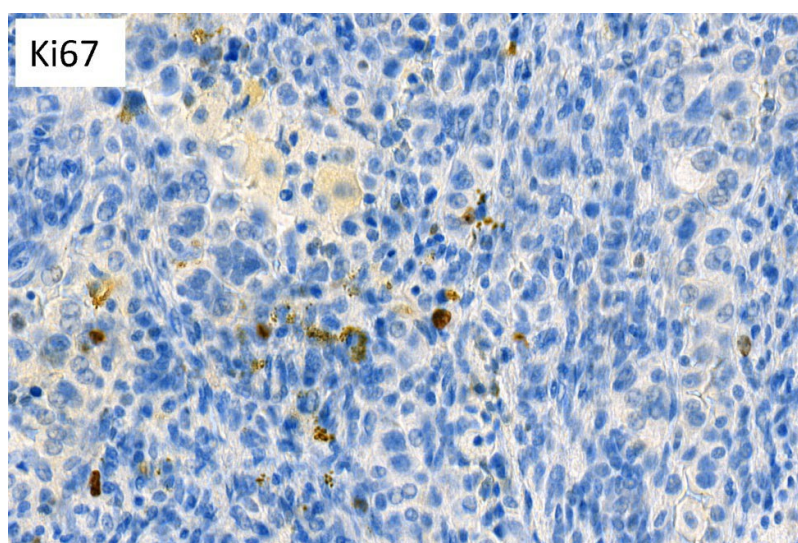
Obrazová príloha



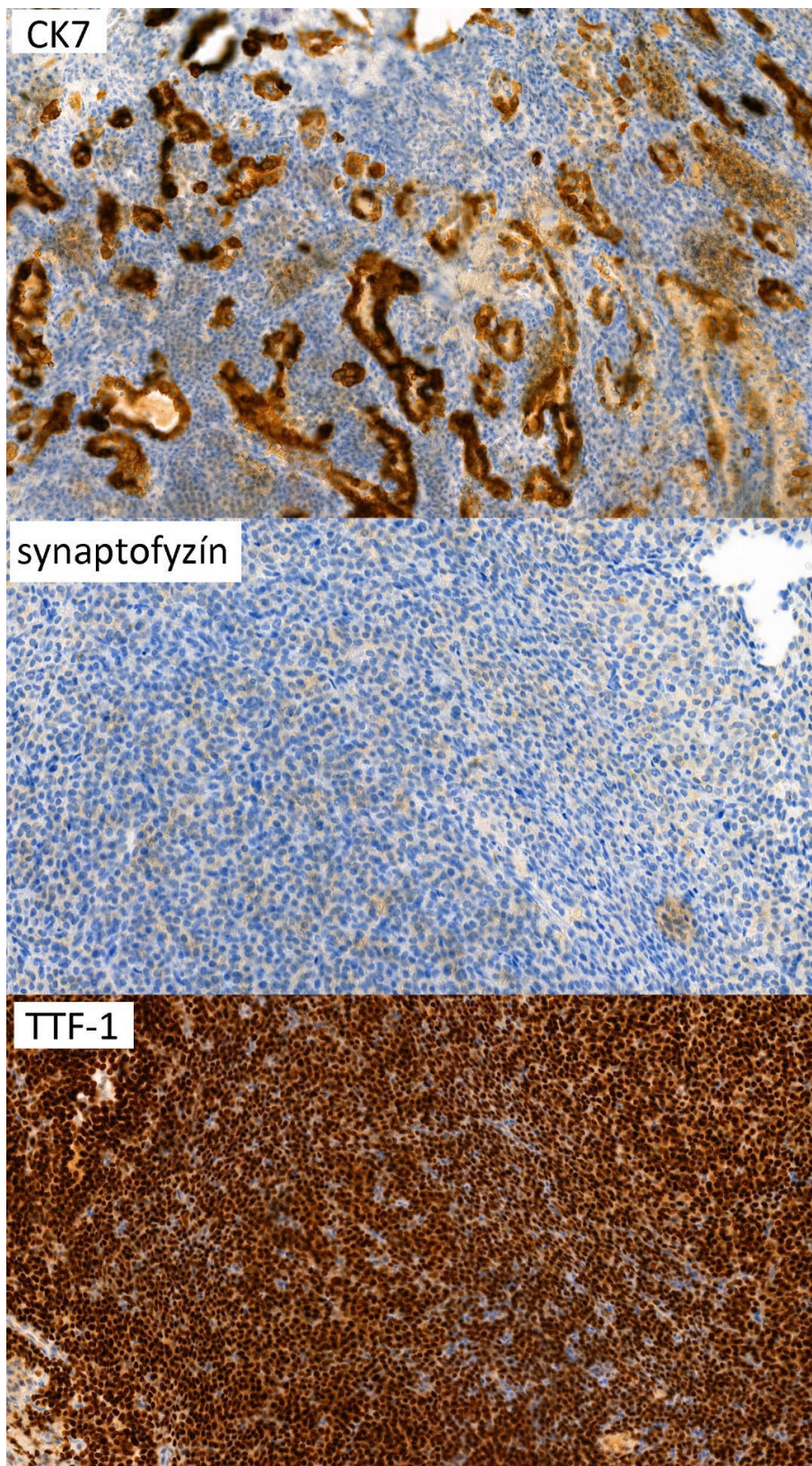
Obrázok 1: CT nález nehomogénnej dobre ohraničenej lézie, zhodnotenej najskôr ako benígny pľúcny hamartóm



Obrázok 2: Nádor zložený z blandných okrúhlych buniek pripomínajúcich proliferáciu neuroendokrinných buniek prítomnú v karcinoidných tumoroch



Obrázok 3: Nízka expresia Ki67, ojedinelá cytoplazmatická pozitivita



Obrázok 4: Kľúčové imunohistochemické vyšetrenia vedúce k diagnóze: CK7, negatívne v populácii stromálnych buniek a pozitívne v povrchových kubických bunkách; synaptofyzín, negatívny výsledok; TTF-1, so silnou jadrovou pozitivitou

Intraduktálna onkocytárna papilárna neoplázia ampuly Vaterskej papily

Marcinek J., Kolenčíková P., Kalman M.

Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Intraduktálne onkocytárne papilárne neoplázie (IOPN) sú zriedkavé nádory postihujúce vývody pankreatobiliárneho traktu, najmä pankreasu. Ide o morfológicky aj geneticky osobité lézie vyčlenené od iných, morfológicky podobných nádorov pankreasu, najmä intraduktálnych papilárnych mucinóznych neoplázií (IPMN). V našom prípade ide o 84 ročnú pacientku s nádorom hlavy pankreasu spôsobujúcim bolesti brucha a ikterus. Tenkohlová aspiračná biopsia a následná duodenopankreatektómia potvrdili diagnózu IOPN ampuly Vaterskej papily, bez sprievodnej invázivnej malignity. Diagnostika týchto lézií môže byť najmä v limitovaných bioptických materiáloch problematická, avšak relatívne špecifická morfológia a imunohistochemický profil umožňujú odlíšiť IOPN od morfológicky podobných a častejších IPMN, alebo iných nádorov pankreasu. Keďže väčšina IOPN sú neinvazívne lézie s dobrou prognózou, kompletná chirurgická resekcia nádoru je zároveň kurabilným zákrokom.

Kľúčové slová: intraduktálna onkocytárna papilárna neoplázia, pankreas, Vaterská papila, histomorfológia.

Úvod

Intraduktálne papilárne mucinózne neoplázie (IPMN) sú neinvazívne, intraluminálne rastúce nádory postihujúce vývody pankreatobiliárneho traktu, ktoré majú potenciál transformácie do invázivnej malignity. Vyskytujú sa najmä vo vývodoch pankreasu, menej často v extrahepatálnych či intrahepatálnych žľazových cestách (Paolino et al). Z histomorfologického hľadiska sa pôvodne klasifikovali na štyri základné typy: intestinálny, gastrický, pankreatobiliárny a onkocytárny typ, avšak posledný z nich bol pre svoje osobité morfológické (Adsay et al.) aj molekulárne genetické črty (Basturk et al. 2016) v poslednej WHO klasifikácii nádorov tráviaceho systému (Gill et al.) vyňatý ako samostatná nozologická jednotka s názvom intraduktálna onkocytárna papilárna neoplázia (IOPN).

Klinická prezentácia prípadu

84 ročná pacientka bola prijatá na kliniku chirurgie pre ikterus s vysokou zápalovou aktivitou.

Na magnetickej rezonancii bol diagnostikovaný tumor hlavy pankreasu priemeru 3,5cm zužujúci ductus

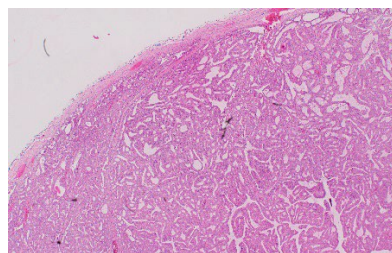
pancreaticus. Pri následnej endosonografii bol potvrdený tento nález so zavedením stentu a odberom tenkoihlovej aspiračnej biopsie (FNAB). Histologické vyšetrenie tohto materiálu vyjadrilo podozrenie na IOPN a keďže pacientka bola v relatívne dobrej fyzickej kondícii bez závažnejších komorbidít, tak napriek vyššiemu veku po stabilizácii klinického stavu podstúpila proximálnu duodenopankreatektomiu.

Histopatologické vyšetrenie

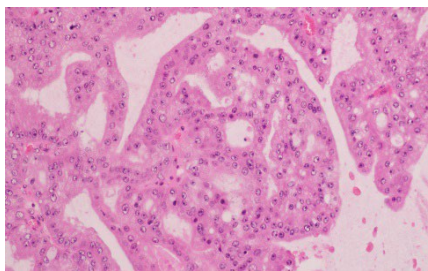
V tkanive hlavy pankreasu sme makroskopicky identifikovali dobre ohraničený nádor veľkosti 3,5x2,5cm lokalizovaný v ampule Vaterskej papily, pred fixáciou vo formaldehyde makroskopicky červenohnedej farby a drobivej konzistencie so sprievodnou dilatáciou pankreatického vývodu (obr. 1). Iné tumorózne ani cystické zmeny sme vo vyšetrenom tkanive nenašli. Histomorfologicky bol nádor tvorený bohato vetvenými, tzv. „arborizovanými“ papilárnymi štruktúrami s malým množstvom fibrovaskulárnej strómy, ktoré miestami splývali do kribiformných štruktúr (obr. 2). Cylindrické nádorové bunky vykazovali objemnú, eozinofilnú, miestami až tzv. okonocytárne diferencovanú cytoplazmu s objemnými, vezikulárnymi jadrami so zreteľnými jadierkami a ojedinelými mitózami (obr. 3). Časť buniek vykazovala intracelulárne vakuoly hlienu, ktorý sa akumuloval najmä v extracelulárnych luminálnych priestoroch (obr. 4). Nádorové štruktúry vyplňali dilatovaný lumen ampuly Vaterskej papily s fokálnym šírením do priľahlých veľkých duktov pankreasu, avšak bez narušenia kontinuity ich steny a znakov invazívneho rastu. Imunohistochemicky nádor exprimoval pozitivitu dôkazov CK7, CK19, HepPar1, MUC6, len ojedinele aj pozitivitu dôkazu synaptofyzin, zatiaľ čo chromograninA a argináza 1 boli negatívne. V časti pankreatických duktov boli zachytené črty low-grade dysplázií, iné patologické zmeny tkaniva pankreasu sme nenašli. Opísaný morfológický obraz a verifikovaný imunoprofil zodpovedali v FNAB suponovanej onkocytárnej papilárnej neoplázii ampuly Vaterskej papily.



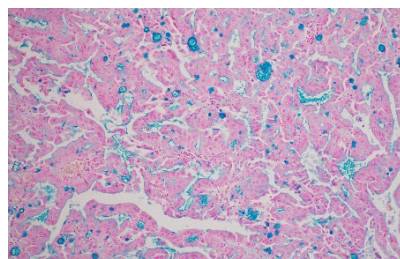
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

Diskusia

IOPN je zriedkavou súčasťou intraduktálnych neoplázií pankreasu (Paolino et al. 2024), pričom tvorí do 5% týchto lézií, avšak jej presnejšia incidencia stále nie je známa (Gill et al. 2019). Postihuje široké vekové spektrum s viac-menej rovnakým postihnutím oboch pohlaví a priemerným vekom v čase diagnózy okolo 60 (Onofrio et al. 2016). Klinicky sa manifestuje najmä bolesťou brucha, resp. symptomatológiou obštrukcie pankreatických ductov (chronická pankreatitída), alebo choledochu (Adsay et al. 1996). Zvyčajne sa vyskytujú ako solitárne cystické lézie hlavného pankreatického ductu, zriedkavejšie ide o viacpočetné lézie lokalizované v postranných pankreatických vývodoch (Onofrio et al. 2016). Špecifická morfológia, genetické abnormality a prognóza týchto neoplázií diametrálne odlišné od mutácií vyskytujúcich sa pri IPMN, resp. ductálnom karcinóme pankreasu (Basturk et al. 2016) viedli k osamostatneniu IOPN od iných pankreatických nádorov. Histomorfologicky je typický komplexný anastomozujúci mikropapilárny rastový vzor, tvoriaci bohato vetvené papilárne až kribriformné štruktúry s výrazne eozinofilnými, tzv. „onkocytárne“ diferencovanými bunkami s objemnými, svetlými jadrami a zreteľnými jadričkami (Adsay et al. 1996, Paolino et al. 2024). Táto high-grade dysplastická morfológia spolu s „pagetoidným“ intraduktálnym šírením môže imitovať invazívnu malignitu (Paolino et al., 2024), avšak skutočná transformácia lézie do adenokarcinómu sa vyskytuje len u 30% týchto nádorov (Adsay et al. 1996, Marchegiani et al. 2015). Diferenciálna diagnostika IOPN môže byť v limitovanom materiáli ako FNAB problematická (Paolino et al., 2024), imitujúca najmä IPMN. V prípadoch solídneho rastového vzoru lézie pripomínajú acinárny karcinóm pankreasu, neuroendokrinné neoplázie, solídne pseudopapilárne neoplázie pankreasu, ale odlišiť treba aj zriedkavé možnosti metastáz onkocytárne diferencovaných nádorov, napr. hepatocelulárneho karcinómu či karcinómu štítnej žľazy (Callander et al., 2023). Relatívne špecifický imunohistochemický profil však umožňuje spoľahlivú diferenciálnu diagnostiku (Basturk et al. 2016), dôležitú pre následný manažment pacientov, keďže väčšina IOPN je neinvazívna a napriek častým lokorecidívam lézie (45% prípadov) prakticky neznižuje dĺžku prežívania (Gill et al. 2019, Marchegiani et al. 2015).

Použitá literatura

- Adsay NV, Adair CF, Heffess CS, et al. Intraductal oncocytic papillary neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol*. 1996 Aug; 20(8): 980-94.
- Paolino G, Bastruk O, Esposito I, et al. Comprehensive Characterisation of Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasm of Pancreas: A Systemic and Critical Review. *Mod Pathol*. 2024 Sep; 37(9): 100554.
- Gill AJ et al. Tumours of the Pancreas. Digestive System Tumours. WHO Classification of Tumours. 5th ed. IARC. 2019; 635.
- Basturk O, Chung SM, Hruban RH, et al. Distinct pathways of pathogenesis of intraductal oncocytic papillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of pancreas. *Virchows Arch*. 2016 Nov; 469(5): 523-32.
- Onofrio D, De Robertis R, Tinazzi Martini P, et al. Oncocystic intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: imaging and histopathological findings. *Pancreas* 2016 Oct; 45(9): 1233-42.
- Marchegiani G, Mino-Kenudson M, Ferrone CR, et al. Oncocytic-type intraductal papillary mucinous neoplasm: a unique malignant pancreatic tumor with good long-term prognosis. *J Am Coll Surg*. 2015 May; 220(5): 839-44.
- Callander R, Johansson M, Rao S, et al. Intraductal oncocytic papillary neoplasm of pancreas: a report of two cases with cytopathological features. *Pathology* 2023 Aug; 55(5): 712-15.
- Basturk O, Chung SM, Hruban RH et al. Distinct pathways of pathogenesis of Intraductal oncocytic papillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of pancreas. *Virchows Arch*. 2016 Nov; 469(5): 523-32.

Karboxypeptidáza B1 u dialyzovaných a nedialyzovaných pacientov vo vzťahu k prítomnosti diabetes mellitus

(pôvodná práca)

Stančík M.¹, Grendár M.², Lazarová Z.³, Mokáň M.¹

¹ I. Interná klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

² Laboratórium bioinformatiky a bioštatistiky, Biomedicínske centrum Martin,

Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

³ Ústav fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Karboxypeptidáza B1 bola dlho známa iba ako pankreas špecifický tkanivový enzým. Recentné objavy umožňujú zaradiť tento enzým medzi adipocytokíny a uremické solúty. Celkovo 142 probandov bolo rozdelených do kontrolnej a cieľovej skupiny. V cieľovej skupine sme pomocou ELISA kitov realizovali u každého dialyzovaného pacienta dve merania plazmatickej koncentrácie karboxypeptidázy B1 po sebe časovým s odstupom jedného mesiaca. V kontrolnej skupine sme realizovali jedno meranie. Pomocou vizuálnej analýzy distribúcií nameraných koncentrácií a ich heuristickým overením pomocou výpočtu Bayesovského informačného kritéria a numerického overenia pomocou Chen & Li testu sme postulovali hypotézu existencie regulačného momentu biologickej povahy, ktorý môže mať antagonizujúci charakter k biologickým účinkom karboxypeptidázy B1.

Kľúčové slová: Dialýza, Karboxypeptidáza B1, Diabetes mellitus, Uremický solút.

Úvod

Medzi molekuly neeliminovateľné štandardnou hemodiafiltráciou patria aj také uremické solúty, ktoré vykazujú toxické pôsobenie. Predmetom záujmu sú najmä tie uremické toxíny, ktorých molekulová hmotnosť je vyššia ako medzná hodnota molekulovej hmotnosti filtrovania solútu bežne používaných dialyzátorov. Dnes používané dialyzátory majú medznú hodnotu molekulovej hmotnosti filtrovania solútu obvykle v intervale 12 – 20 kDa. Dialyzátory s podstatne vyššou medznou hodnotou filtrovania solútu – tzv. „high cut-off“ dialyzátory – majú medznú hodnotu molekulovej hmotnosti filtrovania solútu medzi 50 – 65 kDa a umožňujú eliminovať aj uremické solúty, ktoré sú bežne používanými technikami pri dialýze neodstrániteľné. Z cenového hľadiska sú u nás zatiaľ tieto dialyzátory pre prax nedostupné. Je možné predpokladať, že s rastúcim portfóliom poznatkov v oblasti uremických toxínov sa aj cenová dostupnosť „high cut-off“ dialyzátorov bude zlepšovať.

Medzi uremické solúty s veľkou molekulovou hmotnosťou sa na základe nedávno publikovanej štúdie nášho tímu zaraďuje aj karboxypeptidáza B1 (1). Medzi hlavné výsledky pôvodného projektu patrí odhalenie štatisticky signifikantne zvýšenej koncentrácie CPB1 u pacientov v chronickom hemodialyzačnom programe v porovnaní s nedialyzovanými subjektami. Zistili sme, že koncentrácia CPB1 in-vivo pritom závisí od dialyzačného režimu reprezentovaného počtom sedení dialýzy v priebehu jedného týždňa trvajúceho dialyzačného cyklu. Pri analýze dát pomocou techniky generalizovaného lineárneho zmiešaného modelovania sa prítomnosť diabetes mellitus spolu so zaradením pacienta v dialyzovanej podskupine ukázala ako jediný signifikantný kontribútor k presnosti výsledného regresného modelu. Premenné vek pacienta, pohlavie pacienta z pohľadu tejto analýzy neboli štatisticky významné.

Z hore uvedených poznatkov vyplýva, že hoci prítomnosť diabetes mellitus v regresnej analýze je signifikantným kontribútorom jej presnosti, nález vyšších koncentrácií CPB1 u dialyzovaných pacientov neodráža charakter priamej interakcie po osi diabetes mellitus – CPB1. Podstatnou črtou tejto štúdie bolo použitie dialyzátorov s medznou hodnotou molekulovej hmotnosti filtrovaných solútov ďaleko pod 50 kDa, čo vylučuje možnosť priameho determinovania pozorovanej vysokej koncentrácie CPB1 u pacientov dialyzovaných 2 krát týždenne prostredníctvom samotného procesu eliminácie cieľovej molekuly CPB1 v procese hemodiafiltrácie. Molekulová hmotnosť karboxypeptidázy B1 (CPB1) je totiž až 47 kDa.

Z biochemického hľadiska je CPB1 metalokarboxypeptidáza. Za hlavné miesto jej tvorby v organizme sa historicky považuje pankreas (2). Metódy detekcia génovej expresie umožnili odhaliť aj ďalšie anatomické lokalizácie expresie CPB1, medzi inými najmä omentálne tukové tkanivo, v ktorom je miera expresie zymogénu CPB1 porovnateľná s pankreasom (3). Na modeli s vyradeným génom pre CPB1 sa pozorovala inhibícia tumor supresorovej signalizácie a súčasne aktivácia molekúl zodpovedných za tumorigenézu (4). Ďalším aspektom bioaktivity CPB1 je jej úloha pri regulácii komplementovej kaskády. CPB1 je mediátorom expresie génu pre kaspázu-11 a amplifikátorom pro-apoptotických procesov (5). CPB1 má tiež schopnosť amplifikovať prozápalové odpovede organizmu prostredníctvom štiepenia C – terminálnych rezíduí z anafylatoxínu C3, čím facilituje aktiváciu C3a (6).

Súbor pacientov a metódy

Tento výskumný projekt je pokračujúcou analýzou dát získaných pri riešení výskumného projektu odhaľujúceho molekulu CPB1 ako uremický toxín (1). Projekt bol realizovaný na pôde Dialyzačného centra Univerzitnej Nemocnice v Martine a Jesseniovej lekárskej fakulty na celkovom počte 142 subjektov rozdelených na kontrolnú (n = 111) a cieľovú podskupinu (n = 29). Subjekty v cieľovej podskupine podstupovali pravidelnú dialyzačnú liečbu pre chronickú chorobu obličiek v piatom štádiu (CKD G5d). Merania koncentrácie CPB1 v cieľovej podskupine boli uskutočnené dva

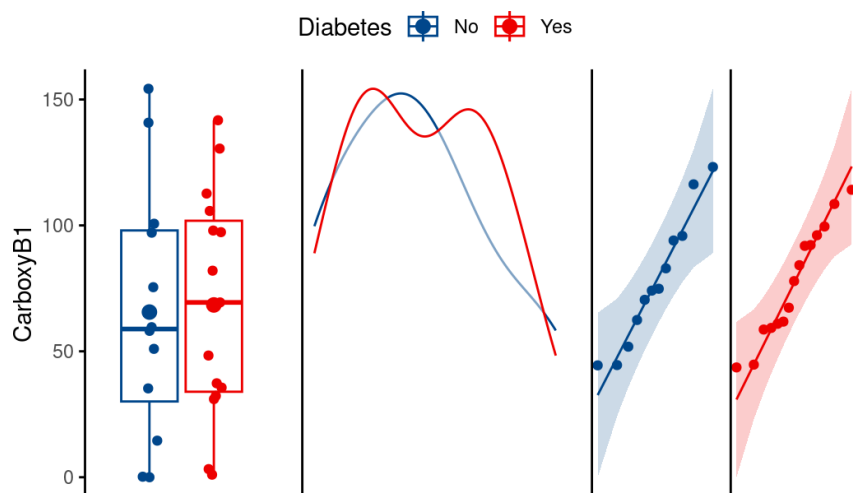
krát s odstupom jedného mesiaca. Celkový počet pozorovaní v analyzovanom datasete bol dostatočne veľký na podrobné štatistické spracovanie ($n = 169$). Subjekty v kontrolnom ramene boli tvorené nedialyzovanými subjektami, z ktorých niektoré mali diagnostikovanú chronickú chorobu obličiek v štádiu G1 – G3a.

Na bližšie objasnenie tejto zdanlivej diskrepancie sme v rámci tejto práce realizovali grafickú analýzu distribúcie koncentrácií CPB₁ v závislosti od prítomnosti diabetes mellitus pre obidve merania u dialyzovaných pacientov, ako aj analýzu distribúcie CPB₁ u nedialyzovaných kontrol. Na numerické vyjadrenie výsledkov grafickej analýzy distribúcie koncentrácií CPB₁ sme použili heuristickú techniku Bayesovského informačného kritéria a zároveň Chen & Li test.

Výsledky

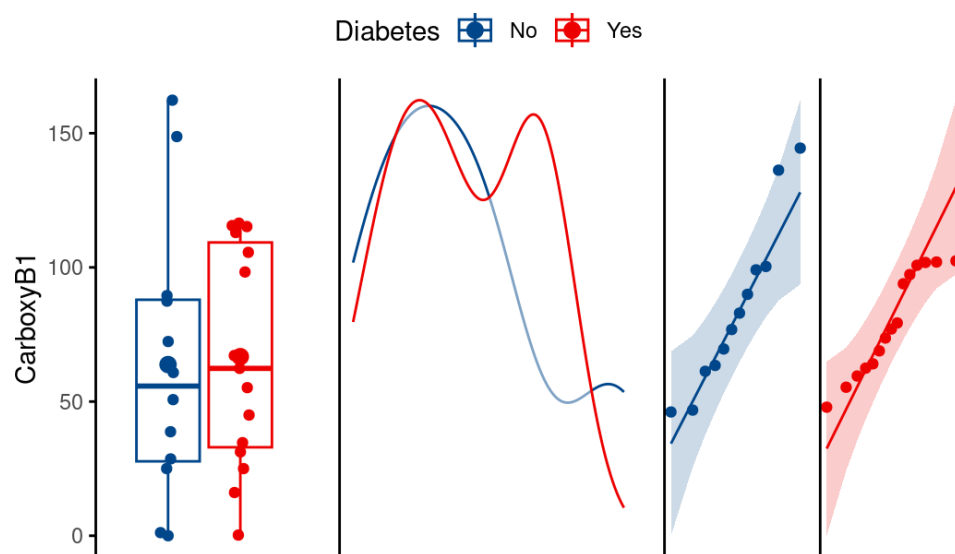
Na základe každého z dvoch meraní koncentrácie CPB₁ v cieľovej podskupine dialyzovaných pacientov zvlášť sme zostrojili distribučné grafy koncentrácie CPB₁ pre jednotlivé polohy faktora diabetes mellitus - diabetes mellitus prítomný (obrázok 2) versus diabetes mellitus neprítomný (obrázok 3). Technikou Bayesovského informačného kritéria sme overili formálnu platnosť prítomnosti bimodálnej distribúcie CPB₁ pri prvom odbere (BIC monomodálna = - 161,18; BIC bimodálna = - 162,58; $p = 0,306$ pre monomodálnu hypotézu) a aj pri druhom odbere (BIC monomodálna = - 153,55; BIC bimodálna = - 157,69; $p = 0,083$ pre hypotézu monomodálnosti). Koncentrácia CPB₁ u nedialyzovaných kontrol je znázornená na obrázku 3. S výnimkou niekoľkých extrémnych prípadov sa obmedzuje na prakticky nulové hodnoty a teda nadobúda distribučný vzor nulovej inflácie.

Obrázok 1



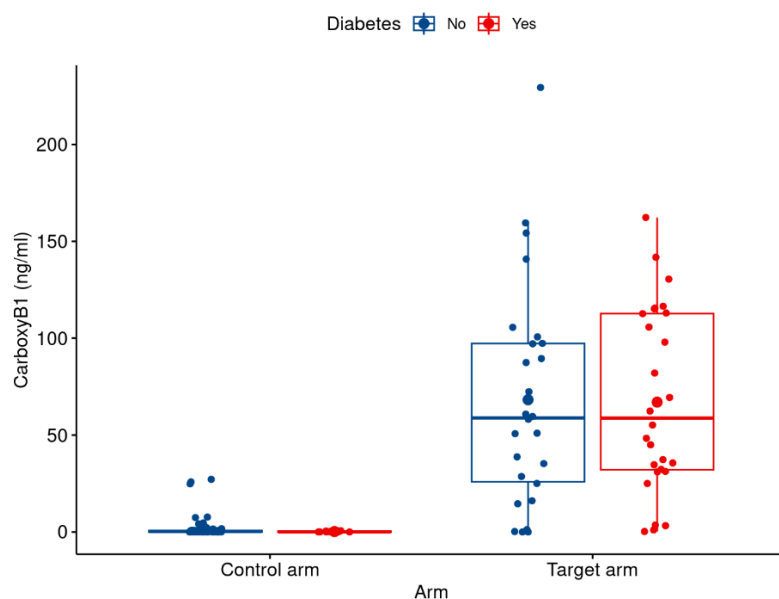
Legenda: Grafy distribúcie koncentrácie CPB₁ v závislosti od prítomnosti diabetes mellitus v čase prvého merania CPB₁ u dialyzovaných pacientov.

Obrázok 2



Legenda: Grafy distribúcie koncentrácie CPB1 v závislosti od prítomnosti diabetes mellitus v čase druhého merania CPB1 u dialyzovaných pacientov.

Obrázok 3



Legenda: Krabicový graf koncentrácie CPB1 u nedialyzovaných pacientov versus dialyzovaných pacientov s oddelením diabetikov od nediabetikov.

Výsledky

Z vizuálnej analýzy distribučných grafov je zrejmé, že aj keď heuristický test iba hranične vylúčil nulovú hypotézu monomodálnej distribúcie pri prvom odbere, prítomná je skutočne bimodálna distribúcia koncentrácií tohto enzýmu, avšak iba u diabetikov. U pacientov bez diabetes mellitus sa

jedná jednoznačne o distribúciu monomodálnu. Pri druhom – opakovanom meraní CPB1 realizovanom s odstupom jedného mesiaca po prvom meraní sa tak vizuálnou inšpekciou distribučného grafu, ako aj heuristickým testom jednoznačne podarilo dokázať existenciu bimodálnej distribúcie koncentrácií CPB1 u diabetikov, zatiaľčo distribúcia koncentrácií CPB1 u nediabetikov bola aj pri tomto meraní jednoznačne monomodálna.

Výsledky analýzy poukazujú na významné rozdiely v regulácii expresie CPB1 u dialyzovaných diabetikov a dialyzovaných nediabetikov. Odlišné je správanie sa inflamazómu vyjadrené expresiou CPB1 u nedialyzovaných pacientov, kde hodnoty koncentrácie tohto adipocytokínu s enzymatickou aktivitou sa uniformne v celom kontrolnom súbore blížila nule.

Keďže biologický polčas molekuly CPB1 in vivo dosahuje hodnoty okolo 10 minút, možno hypotetizovať, že zmeny koncentrácie CPB1 u dialyzovaných diabetikov odrážajú definovateľnú fyziologickú reguláciu aktivácie inflamazómu a nie problematickú elimináciu CPB1 z organizmu.

Záver

Existuje významný rozdiel v regulácii plazmatickej koncentrácie CPB1 medzi dialyzovanými diabetikmi a dialyzovanými pacientmi bez diabetes mellitus, ktorý sa nedá pripísať náhodnej fluktuácii sledovanej veličiny. Predpokladáme, že bimodálna distribúcia koncentrácií CPB1 je odrazom existencie regulačného momentu biologickej povahy, ktorý môže mať antagonizujúci charakter k biologickým účinkom CPB1. Cieľom ďalšieho výskumu je definovanie kontraregulačného faktora vysvetľujúceho zmeny koncentrácie CPB1 zistené medzi prvým a druhým meraním tohto adipocytokínu.

Použitá literatúra

- Stančík, M., Grendár, M. & Mokáň, M. Carboxypeptidase B1 in dialyzed chronic kidney disease patients. *Sci Rep* 15, 4254 (2025).
- Tan AK, Eaton DL. Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma. *Biochemistry*. 1995;34(17):5811-5816.
- Bastian FB, Roux J, Niknejad A, Comte A, et al. The Bgee suite: integrated curated expression atlas and comparative transcriptomics in animals. *Nucleic Acids Research* 2021; 49:D831 – D847.
- Kothari C, Clemenceau A, Ouellette G, et al. Is Carboxypeptidase B1 a Prognostic Marker for Ductal Carcinoma In Situ?. *Cancers (Basel)*.
- Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, et al. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. *J Exp Med*. 2016;213(11):2365-2382.
- Wang Y, Liu W, Xu Y, et al. Revealing the signaling of complement receptors C3aR and C5aR1 by anaphylatoxins. *Nat Chem Biol*. 2023;19(11):1351-1360.


Keratosi actinica – najčastejšia prekanceromatóza kože

Kolenčíková P.^{1,2}, Procházková J.³, Adamicová K.^{1,2}

1. Konzultačné centrum bioplickej diagnostiky kožných ochorení na Ústave patologickej anatómie
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
2. Ústav patologickej anatómie Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave
3. Klinika stomatólogie a maxilofaciálnej chirurgie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Aktinická keratóza pôvodne zaraďovaná medzi obligátne prekancerózy sa dnes niektorými autormi považuje za včasné neoplastické ochorenie („carcinoma in situ“). V literatúre je uvádzaná aj ako solárna keratóza. Ide o veľmi časté ochorenie starších ľudí, zvyčajne mnohopočetné na oslnených miestach kože. Existuje fenotypická rozmanitosť histologického obrazu a pomerne častý prechod do invazívnych karcinómov kože. Autori v práci prezentujú súbor aktinických keratóz diagnostikovaných v jednom roku v Konzultačnom centre bioplickej diagnostiky kožných ochorení na Ústave patologickej anatómie JLF UK v Martine

Kľúčové slová: aktinická keratóza  prekanceróza

Úvod

Aktinická keratóza (AK), nazývaná aj „solárna keratóza“ alebo „senilná keratóza“ je kožné poškodenie, tradične zaraďované do skupiny prekanceróz. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie ide o bežnú intraepidermálnu neopláziu slnkom poškodenej kože, s rôzne vyjadrenou atypiou keratinocytov (1). Má vzhľad drsného šupinatého ložiska alebo ložiska s krustou na povrchu. Klinicky sú ložiská lepšie palpovateľné, než viditeľné. AK vzniká v takých topografických oblastiach kože, ktoré sú vystavené slnečnému žiareniu a viac u ľudí so svetlou pleťou. AK sa najčastejšie vyvíja v miestach poškodenia kože UV žiarením najčastejšie u ľudí, ktorí sa často opaľujú na slnku alebo v soláriách. AK sú známe prekancerózy kože. Bez terapie sa z nich vyvíjajú kožné karcinómy a to najčastejšie skvamocelulárny karcinóm (v 20 % prípadoch), menej často bazocelulárny karcinóm resp. iné typy kožných karcinómov. Početnosť vzniku AK stúpa mohutnosťou expozície UV žiarenia počas života a je preto oveľa častejšia u starších ľudí. Ložisko charakteru „šmirgľa“ môže byť tmavé, svetlé, opáleno-

svetlohnedé, ružové, červené alebo kombinované. Nie je výnimkou, keď AK má rovnakú farbu, ako je farba okolitej kože (2).

AK nebývajú veľké. Najčastejšie majú 2 mm až 6 mm. Niekedy sú však aj prípady s veľkosťou niekoľkých centimetrov. Najčastejšie postihnutými sú oblasti tváre, uší, hrudníka, chrbtov rúk a pery. Môžu byť solitárne ale vyskytujú sa najmä mnohopočetne (3).

Patogenéza

AK vzniká u ľudí bielej populácie, ako následok excesívneho účinku UV žiarenia, najmä UVB frakcie (280-320nm) a to s latenciou približne 10 – 20 rokov. Bielej rase chýba väčší protektívny účinok, spôsobený menším množstvom epidermálneho melanínu, oproti tmavším rasám. AK sú bežné u jedincov so zvýšenou senzitivitou k efektu UV žiarenia, ako napr. možno zistiť u albínov, či pacientov so xeroderma pigmentosum. Taktiež pracovníci, vykonávajúci činnosť v exteriéroch na slnečných lokalitách, majú vyššie riziko vzniku AK (farmári, námorníci) (4). V poslednom období sa opisuje zvýšený výskyt AK u detí, ktoré sú vystavované intenzívnemu slnečnému žiareniu. Podobne je zaznamenaný vyšší výskyt AK u pacientov liečených hydroxyureou (2). Má sa za to, že pôsobením UV žiarenia dochádza k zmene genetického materiálu (somatická mutácia) epidermálnych buniek s následnou premenou v atypické bunky. Tieto atypické bazaloidné bunky prestupujú normálnu štruktúru epidermy a vedú k poruchám rohovatenia. Ak endofyticky preniknú cez bazálnu membránu a infiltrujú kórium, vzniká infiltratívny karcinóm (Braun-Falco). AK geneticky vykazuje vyšší počet anuploidie buniek s výnimkou klonálnych karyotypických abnormít a často sa stráca heterozygotnosť 17p, 17q, 9p a 9q, a vykazuje instabilitu mikrosatelitov. Zároveň sa zvyšuje podiel mutácií na CDKN2 a p53 (5). Táto zmena, mutácia p53, býva detegovaná vo väčšine prípadov AK v kaukazskej rase. (75 % - 80 %), kým u aziatov je výskyt mutácie p53 signifikantne nižší ((20 – 30 %) (6). Expresia CD95 (Fas) je redukovaná v AK, pri porovnaní s jej expresiou v slnkom poškodenej koži bez dysplázie. Pacienti s nulovým glutation-S-transferázovým M1 fenotypom majú zvýšené riziko vývoja AK. Bezprostredný priamy účinok UV žiarenia na vznik AK bol opakovane dokázaný aj na laboratórnych zvieratách. Iradiácia priamo poškodzuje DNA keratinocyty a nepriamo suprimuje imunologický dohľad (numerická redukcia Langerhansových buniek, supresia tumor suprimujúcich génov p53). Fotokancerogenéza pokračuje expanziou mutovaných klonov buniek, hyperproliferáciou a stratou apoptózy (2, 7, 8).

Tab. 1 Klinické varianty AK

Typ	Opis
Klasické (bežná)	Biela, šupinatá makula, papula, ložisko rôznej hrúbky s erytémom
Hypertrofická (hyperkeratotická)	Hrubá šupiny na povrchu ložiska adherujúca k erytematóznemu ložisku
Atrofická	Hladká lézia, so zmenou farby ložiska
AK s „cornu cutaneum“	Kónická rohová prominujúca lézia
Pigmentová	Hnedá lézia, podobná ako solárne lentigo alebo lentigo maligna
Aktinická cheilitis	Šupinaté ložisko na pere s pocitom suchosti
Bowenoidná	Solitárne erytematózne ložisko s ostrejším ohraničením

Prítomnosť ulcerácie, nodularity alebo krvácania je vždy podozrivá s malígne transformácie AK. Zvýšené riziko malignizácie AK sa hodnotí podľa tzv. IDRBEU / (akronymá anglických výrazov, teda **I**ndurácia/**I**nflamácia, **D**iameter, **R**apid Enlargement - rýchlosť rastu, **B**leeding – krvácanie, **E**rytém, **U**lcerácia. Bežne je AK diagnostikovaná spoľahlivo klinikom už makroskopicky. Keďže v niektorých prípadoch je diferenciálna diagnostika medzi AK a malígnym nádorom kože problematická, táto lézia je často excidovaná z cieľom určenia jednoznačnej bioptickej diagnózy (2).

Bioptická diagnóza

V prípadoch keď AK je väčšia ako v bežných prípadoch, t.j. nad 6 mm, keď je výrazne zhrubnutá, krváca, alebo pacient udáva rýchlejšiu zmenu veľkosti a charakteru lézie, je potrebné bioptické vyšetrenie. Najčastejším diagnostickým problémom býva odlišenie zmenenej AK od skvamocelulárneho karcinómu, ale aj od ďalších entít ako napr. seborrhoickej keratózy, bazocelulárneho karcinómu, lichenoidnej keratózy, porokeratózy, vírusových bradavíc, zápalových dermatóz alebo od malígneho melanómu.

Odber excízie pre bioptickú diagnózu sa v literatúre niekedy odporúča „shave“ alebo „punch“ metódou. Keď je AK menšia, je vždy vhodnejšie ju extirpovať léziu „in toto“, klasickým chirurgickým postupom, ktorý v takýchto prípadoch býva nie „len“ diagnostickým, ale aj terapeutickým výkonom. Histologické vyšetrenie v typických prípadoch nie je komplikované. Bioptik nachádza skupiny atypických keratinocytov s hyperpigmentáciou a/alebo s pleomorfnými jadrami najmä v bazálnej časti epidermy. Na povrchu býva hrubá ortokeratóza s ložiskami parakeratózy. V epiderme sa stráca normálna stratifikácia a možno pozorovať cytologické atypie, rozšírenie intercelulárnych priestorov,

abnormálne veľké jadrá keratinocytov a pod. Pod bazálnou membránou býva výrazná nešpecifická zápalová reakcia. V okolitej koži sú aktinické zmeny rôzneho stupňa, najmä výrazná bazofilná degenerácia dermy (obr. 1).

Tento histologický opis býva modifikovaný v niektorých léziách, ktoré možno podľa atypických keratinocytových proliferácií rozdeliť do siedmych hlavných histologických variantov AK (9).

Tab. 2 Histologické varianty AK

Typ	Opis
Hypertrofická	Výrazná hyperkeratóza s parakeratózou. V stratum Malphigii je strata polarity, pleomorfia a anaplázia. Môže byť prítomná nenádorová akantotická proliferácia epidermy (obr. 2).
Atrofická	Mierna hyperkeratóza a atrofické zmeny epidermy. Bazálna vrstva obsahuje bunky s veľkými hyperchrómnymi jadrami, s hustým nakopením buniek. Tieto bunky proliferujú v úzkych „duct-like“ štruktúrach do dermy (5).
Lichenoidná	Obsahuje typický lichenoidný zápalový infiltrát prekrývajúci dermo-epidermovú junkciu, cytoidné telieska, bakuolárnu degeneráciu bazálnych buniek, inkontinenciu melanínu
Akantolytická	Dyskeratotické bunky s ruptovanými intercelulárnymi mostíkmi vytvárajú v najpovrchnejšej vrstve epidermy štrbiny alebo lakúny (obr. 3)(8).
Bowenoidná	Histologicky nerozlíšiteľná lézia od Morbus Bowen. Ide o ložiská atypie postihujúce celú hrúbku epidermy. Okolie lézie je s aktinickými zmenami kože (obr. 4) (9).
Epidermolytická	Prítomnosť granulárnej degenerácie
Pigmentová	So zvýšenou prítomnosťou melanínu v bazálnej časti epidermy .

Fenotyp AK je však oveľa pestrejší. V praxi sa možno stretnúť aj s inými fenotypmi AK, napr. tzv. „clear cell“ typ, ktorý sme diagnostikovali aj v našom materiáli.

Výskyt AK v našom materiáli

Vyšetrili sme 79 prípadov histologicky hodnotených ako aktinická keratóza. Išlo o excízie kože od 40 žien (vyšetrených 42 excízií) a 32 mužov (vyšetrených 37 excízií). Vek pacientov bol od najmladšej 38 ročnej ženy resp. 44 ročného muža až po 90 ročného muža resp. 91 ročnú ženu. Priemerný vek bol u mužov 69 rokov a u žien 70 rokov. Lokalizáciu diagnostikovaných lézií sme zoradili do tabuľky 3. v oblastiach podľa topografických kódov, podľa ktorých sa zaraďujú karcinómy kože (C44.0-9) resp. benígne nádory kože (D23.0-9). Ani jeden z nádorov nezasahoval do viacerých definovaných oblastí (.8 – 0) a žiadnej lézii nechýbalo topografické zaradenie (.9 – 0)

Tab. 3 Lokalizácia diagnostikovaných aktinických keratóz u mužov a žien

Lokalizácia T173.0 - 9	Muži	Ženy
.0 (pera)	2	4
.1 (mihalnica)	0	1
.2 (ušnica)	2	0
.3 (nešpecifikovaná časť tváre)	15	25
.4 (hlava a krk)	13	1
.5 (hrudník)	1	0
.6 (horná končatina)	3	7
.7 (dolná končatina)	1	4
Spolu	37	42

V biopsicky vyšetrených 79 AK sme v 16 prípadoch (20,2 %) zistili aj niektorý z epidermálnych karcinómov kože a to „carcinoma in situ“, skvamocelulárny karcinóm (obr. 5), bazocelulárny karcinóm a v jednom prípade metatypický karcinóm (tab. 4).

Tab. 4 Nález karcinómov v teréne aktinickej keratózy

Typ	Muži	Ženy
AK + CIS	4	3
AK + SCC	2	1
AK + BCC	2	3
AK + iné (metatypický CA)	1	0
Spolu	9	7

Diskusia

Vznik skvamocelulárneho karcinómu (SCC) na podklade AK je veľmi častý (viac ako 80 % (10). Výskyt SCC na podklade AK sme zistili aj v našom sledovaní, avšak v 7 prípadoch išlo o CIS a v troch

prípadoch o invazívny SCC (obr. 5). Pri tejto malignizácii sa predpokladá delécia chromozómu 9p21, pri kódovaní p16 tumor supresorového génu (CDKN2A). Taktiež býva prítomná aktivácia ras onkogénu regulujúceho stratu p53 tumor supresorového génu a úbytok zápalovej celulizácie v AK, čo môže byť predpokladom vzniku invazívneho karcinómu (5, 6, 7, 11). Nadprodukcia p16 sa spája so vznikom CIS, avšak nie je dokázaná pri vzniku AK. UV žiarením indukovaná imunosupresia taktiež môže zohrávať úlohu pri vzniku karcinómu ale táto rola nie je detailne preskúmaná. Existujú štúdie, v ktorých sa zistilo, že pacienti s transplantáciou obličiek majú zvýšené riziko vývoja AK s transformáciou do SCC (2). V súčasnosti neexistuje žiadny dôkaz pre vznik AK a jej karcinomatóznou premenu spôsobenú Epstein- Barrovej vírusom, alebo herpesvírusom 8, avšak dokázané je široké spektrum HPV typov u AK a to tak u imunokompetentných ako aj imunosuprimovaných pacientov. Tieto vírusy bývajú detegované iba v najpovrchnejších vrstvách epidermy (2, 12).

Existujú pestré histopatologické fenotypy AK. Všetky obsahujú črty epitelovej dysplázie a to od miernych zmien v dolnej tretine epidermy, až po carcinoma in situ (CIS), často s povrchovými ložiskami parakeratózy. Pokus určiť stupeň dysplázie ako keratinocytová intraepidermálna neoplázia (KIN) v prípadoch AK, analogicky, ako sa určuje CIN u čapíka maternice, nemá význam, ako opakovanne zistili viaceré výskumné tímy. KIN nemusí byť prítomná v predchodoch vzniku invazívneho SCC z AK (2, 10, 13).

Jedným z osobitých typov AK je jej hyperkeratotická/hyperplastická forma. Typické pre túto formu AK je hrubá vrstva alterujúcej parakeratózy a kompaktnej ortokeratózy. Ložiská dysplastického epitelu sa striedajú s ložiskami epitelu bez dysplázie so „zátkovaním“, zvyčajne v oblasti folikulárnych ostii a ostíí potných žliaz (Freudentalov tunel či „Freudenthal funnel“). Ďalším typom AK je proliferatívna aktinická keratóza s typickým „budding“, čo znamená proliferácia okrúhlych (púčikových) výbežkov epidermy do papilárnej dermy. Niektoré AK sú atrofické a niektoré majú známky akantolýzy. Táto akantolytická (pseudoglandulárna) forma AK môže niekedy pripomínať morbus Darier. V prípadoch, keď v celej hrúbke epidermy AK nachádzame dysplastické keratinocyty, léziu klasifikujeme ako Bowenoidný typ AK alebo carcinoma in situ. Bowenoidný typ AK je spojený so stratou desmozómov a hemidesmozómov, čo je príčinou agresívnejšieho správania sa tohto typu AK. Typ AK označovaný ako „jasno bunkový typ AK“ (clear cell AK), vyjadruje väčšiu prítomnosť glykogénu, čo je niekedy dôkazom pre epidermolytický typ AK (1, 2).

Derma pod AK a v okolí takmer vždy ukazuje výrazné zmeny solárnej elastózy (bazofilnej degenerácie) a ektatické cievy horného vaskulárneho plaxu. Obligátnou súčasťou všetkých typov AK je výrazná prevažne lymfocytová alebo zmiešaný lymfocytovo-histiocytová zápalová infiltrácia hornej dermy. Táto celulizácia často pokrýva zmeny na úrovni dermo-epidermovej junkcie, ako napr. vakuolárnu dystrofiu bazálnych buniek epidermy a výskyt apoptotických (cytoidných) teliesok. Tieto zmeny charakterizujú tzv. lichenoidnú AK. V rámci diferenciálnej diagnózy od iných lichenoidných

zmien kože je dôležitý výskyt atypických jadier v keratinocytoch lichenoidnej AK. Pagetoidný typ AK je zriedkavý a keď je prítomný, ide zvyčajne o CIS. Histopatologický obraz pagetoidnej AK je charakterizovaný výskytom jednotlivých dysplastických keratinocytov, alebo ich drobných skupiniek v epiderme. Pripomína extramamárnu Pagetovu chorobu, od ktorej by mala byť takáto AK diferenciálno-diagnosticky odlišená(1, 2, 9, 11).

AK môže byť pigmentovaná. Melanín býva nepravidelne zvýšený v množstve v bazálnej časti epidermy, ako aj v keratinocytoch a v histiocytových melanofágoch dermy. Tento variant niektorí autori menujú ako pigment šíriaca AK. V takýchto prípadoch je potrebné byť opatrný pri bioptickej diagnostike a jednoznačne odlíšiť túto léziu od in situ melanómu lentigo maligna (LM). Najspoľahlivejšie vylúčime LM použitím imunohistochemických postupov, teda negativitou S-100 proteínu, antigénu Melan A a HMB-45. AK vznikajúca u imunosuprimovaných pacientov sú častom výrazne hyperkeratotické, s konfluujúcou vrstvou parakeratózy a početnejšími mitózami. Početné mitózy charakterizujú tiež AK u mladších pacientov, najmä mužov. V posledných rokoch sa zistila korelácia medzi expresiou tenascínu a výskytom stupňa dysplázie v AK (1, 14).

Diferenciálna diagnostika

Najbežnejší problém v praxi je histopatologické odlíšenie proliferujúcej AK od incipientného SCC. Takmer všetky patologické črty sú u oboch lézií podobné (atypické keratinocyty, „single“ alebo v malých skupinkách), s výraznou stromálnou reakciou, ktorá môže prekryť mikroinvazivitu SCC). Pri podozrení na malígny zvrät AK je potrebné vykonať sériové zrezanie lézie. Vykonáva sa to aj v tých prípadoch, keď v klinickej praxi odlíšenie týchto dvoch lézií nie je až tak významné, pretože obidve lézie sa extirpujú kompletne in toto.

Odlíšenie AK od superficiálneho BCC je tiež niekedy komplikované. Definitívne pomôže imunohistochemický dôkaz bcl-2 a Ber-EP4. Obidve metódy sú pozitívne u BCC a negatívne u AK (1, 2, 9, 12, 13, 14).

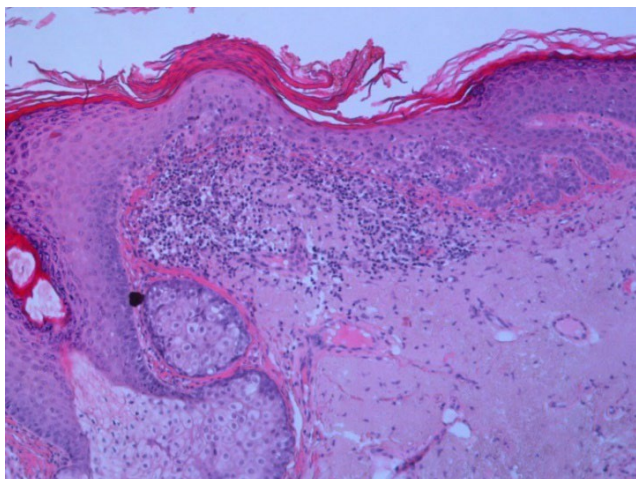
Záver

Považovať aktinickú keratózu napr. s minimálnou dyspláziou keratinocytov za počínajúci karcinóm by nebolo vhodné. Klinický vývoj AK môže pretrvávajúť veľmi dlhú dobu bez zmeny, ba dokonca môže spontánne regredovať, čo nie je bežné pri pravých neopláziách (13). V klinickej praxi je dôležité AK rozpoznať, a postupovať podľa platných ablatívnych či neablatívnych liečebných modalít. V prípade pozitívnej biopsie s nálezom karcinómu v AK je potrebné pacienta dispenzarizovať a poučiť o preventívnych zmenách v životnom štýle.

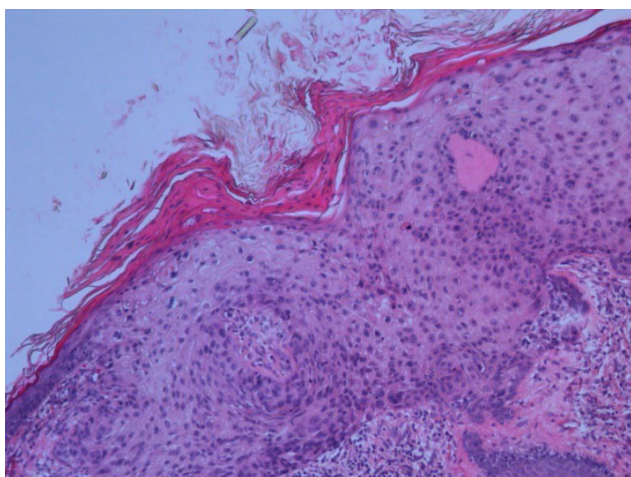
Použitá literatúra

- James C, Crawford RI, Martinka M, Marks R: Actinic keratosis In: Pathology and Genetics Skin Tumours, Ed. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A., World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press Lyon 2006, 30-33
- Calonje E, Brenn Th, Lazar A, McKee P H: Tumours of the surface epithelium. In: McKee Pathology of the skin. Rd. Calonje E, Brenn Th, Lazar A, McKee P H: 4th Ed. Elsevier Limited 2012, 1076 – 1150 s.
- Poláková K: Účinky topického imunomodulátoru (imiquimodu) v liečbe aktinickej keratózy. *Dermatol. Prax*, 2009, 3(4):148-150
- Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. Jan 2000;42(1 Pt 2):4-7.
- Kanellou P, Zaravinos A, Zioga M, Stratigos A, Baritaki S, Soufla G, et al. Genomic instability, mutations and expression analysis of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in actinic keratosis. *Cancer Lett*. Jun 8 2008;264(1):145-61.
- Einspahr J, Alberts DS, Aickin M, Welch K, Bozzo O, Grogan T, Nelson M: Expression of p53 protein in actinic keratosis, adjacent, normal-appearing, and non-sun-exposed human skin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997, 6(8), 583-7
- Stanimirovič A, Čupič H, Bošnjak B, Krušlin B, Belicza M: Expression of p53, bcl-2 and growth hormone receptor in actinic keratosis, hypertrophic type. *Arch Dermatol Res*, 2003, 295:102-108
- Dan X, Ruihong Y, Hua G, Tongyun L, Ying T, Zhi Y, Li H: The effect of ultraviolet radiation on the transforming growth factor beta1/Smads pathway and p53 in actinic keratosis and normal skin. *Arch Dermatol Res*, 2013, 305(9), 777-786
- Coleman NM, Reed JA: Actinic keratosis Pathology: 20. 04. 2015
<http://emedicine.medscape.com/article/1976538-overview>
- Burgdorf, W., Plewig, G., Wolff, H., et al. Braun-Falco's Dermatology . : 3rd ed. Heidelberg: Springer – Verlag, 2009. 1712 s., ISSN.
- Grizzle, W., Srivastava, S., Manne, U. The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia. *Cancer Biomark*. 2011. 9 (1 - 6), s. 21-39.
- Macbeth, A., Grindlay, D., Williams, H. What's new in skin cancer? An analysis of guidelines and systematic reviews published in 2008-2009. *Clin Exp Dermatol*. 2011, 36 (5), s. 453-458.
- Bartoš V, Adamicová K, Péč M: Aktinická keratóza: poznatky o biologickom správaní a klinicko-patologických aspektoch ochorenia a klinicko-patologických aspektoch ochorenia z pohľadu bioptika. *Prakt Lék*, 2011, 91(11) s. 648-652
- Fernández-Figueras MT, Pérez Muñoz N. Actinic keratosis. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/skintumornonmelanocyticactinickeratosis.html>. Accessed February 12th, 2025.

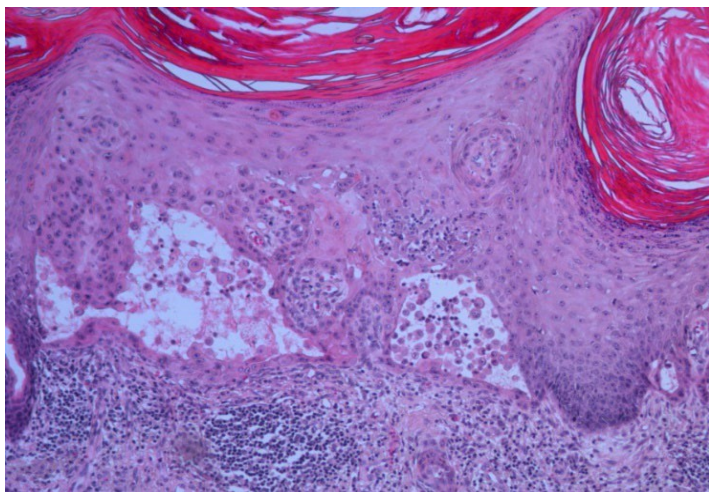
Obrázková príloha



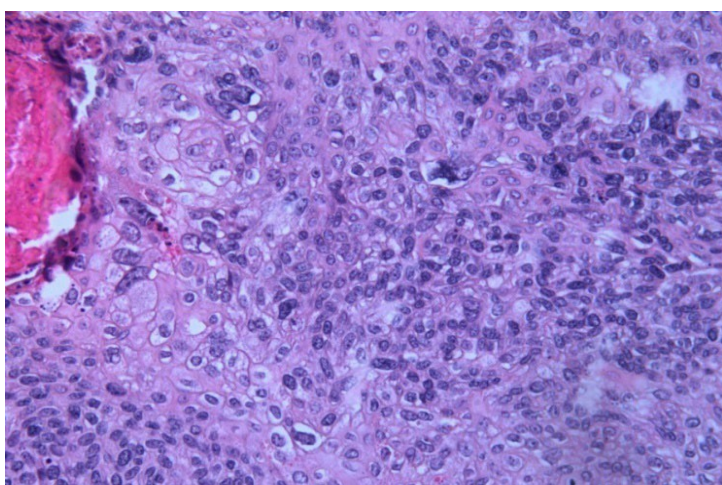
Obr. 1 Typický histopatologický obraz aktinickej keratózy. Rôzne hrubá epiderma s „akantotickými púčikmi“ (vpravo), so „single cell“ dyspláziou keratinocytov, s hrubou vrstvou kompaktnej keratózy s ložiskami parakeratózy a so stredne intenzívnym zápalovým infiltrátom hornej dermy s výraznou bazofilnou degeneráciou (HE, 1000x)



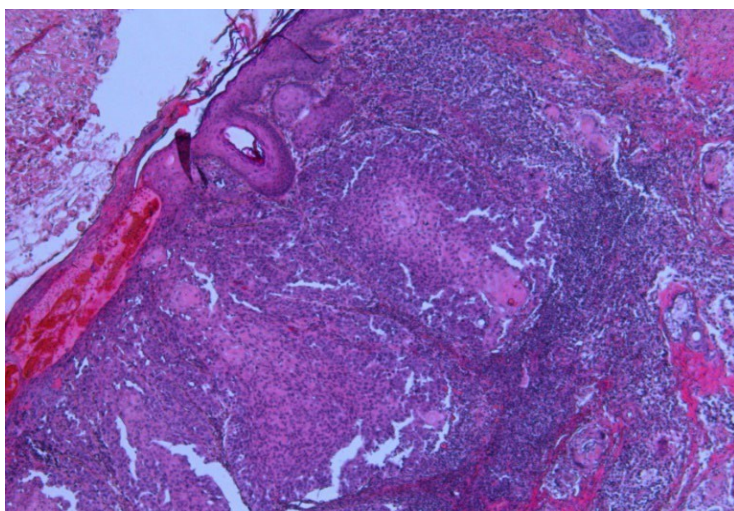
Obr. 2 Parakeratóza, hyperplázia epidermy s dyspláziou keratinocytov a zápalový infiltrát v hornej derme. Hyperplastický typ aktinickej keratózy (HE 150x)



Obr. 3 Akantolytický typ aktinickej keratózy (HE 200x)



Obr. 4 Ťažká dysplázia, „carcinoma in situ“ v aktinickej keratóze (HE, 400x)



Obr. 5 Skvamocelulárny karcinóm v teréne aktinickej keratózy (HE, 50x)

Adresa prvého autora:

MUDr. Petra Kolenčíková, PhD.

Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM

Kollárova 2

036 59 Martin

Komunikácia s osobami so sluchovým postihnutím v systéme zdravotnej starostlivosti – výzvy a príležitosti pre vzdelávanie

Zanovitová M., Lepiešová M., Kuviková M.

Ústav ošetrovateľstva, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Osoby so sluchovým postihnutím patria medzi zraniteľné skupiny v spoločnosti. Ich prístup k zdravotnej starostlivosti je často obmedzený komunikačnými a legislatívnymi bariérami. Nedostatok tlmočnickov posunkového jazyka a obmedzené možnosti využívania asistenčných služieb môžu znižovať kvalitu poskytovanej zdravotnej starostlivosti. Cieľom štúdie bolo identifikovať faktory, ktoré ovplyvňujú komunikáciu s osobami so sluchovým postihnutím pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti, a na základe týchto zistení navrhnúť a realizovať edukáciu pre študentov ošetrovateľstva. Zber dát bol realizovaný pomocou neštandardizovaného dotazníka, ktorý bol distribuovaný medzi 53 respondentov so sluchovým postihnutím. Výsledky ukázali opakované problémy v komunikácii, nedostatok efektívnych spôsobov dorozumievania, vrátane nejasností pri komunikácii so zdravotníckym personálom a nadmerného používania odborných výrazov. Edukačné jednotky pre študentov ošetrovateľstva, ktorí sa pripravujú na rolu budúcich sestier, boli prakticky orientované na zlepšenie komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím. Štúdia potvrdila potrebu systematického vzdelávania zdravotníckeho personálu v oblasti komunikácie s touto skupinou pacientov. Implementácia edukačných programov môže prispieť k zlepšeniu dostupnosti a kvality zdravotnej starostlivosti pre osoby so sluchovým postihnutím.

Kľúčové slová: sluchové postihnutie, zdravotná starostlivosť, komunikácia, posunkový jazyk, vzdelávanie

Úvod

Komunikácia medzi pacientom a zdravotníckym pracovníkom je neoddeliteľnou súčasťou poskytovania zdravotnej starostlivosti. Pri poskytovaní ošetrovateľskej starostlivosti sa sestry môžu stretnúť s pacientmi, ktorí vyžadujú špecifický komunikačný prístup, ako sú osoby so sluchovým postihnutím. Ich spôsob dorozumievania sa líši v závislosti od stupňa straty sluchu. Osoby so sluchovým postihnutím patria medzi zraniteľné skupiny spoločnosti, keďže ich postihnutie nie je na prvý pohľad zjavné a prejavuje sa najviac pri komunikácii. Tieto bariéry sú ďalej ovplyvnené komunikačnými, informačnými, technickými, psychogénnymi a legislatívnymi prekážkami (Beňo et al., 2015; Slowík, 2016). Na Slovensku sa problémy prehľbujú nedostatkom kvalifikovaných tlmočnikov a osobných

asistentov, čo obmedzuje prístup sluchovo postihnutých osôb k službám a informáciám (Zákon č. 447/2008 Z.z.; Zákon č. 448/2008 Z.z.). V oblasti zdravotnej starostlivosti sa tieto osoby často stretávajú s problémami v komunikácii, nedostatkom informácií a obmedzenou dostupnosťou služieb.

Komunikácia s osobami so sluchovým postihnutím si vyžaduje flexibilitu, prispôsobivosť a zohľadnenie ich individuálnych potrieb. Je závislá od rozsahu a závažnosti sluchového postihnutia a delí sa na primárne a sekundárne formy. Primárne formy zahŕňajú hovorený jazyk, posunkový jazyk a písomnú formu. Sekundárne formy komunikácie zahŕňajú prstové znaky, bimodálne formy, špecifické posunkové formy, odzveranie a neverbálnu komunikáciu (Birka, Verešová, 2015). Kľúčovou je neverbálna komunikácia, ktorá zahŕňa gestikuláciu, mimiku, proxemiku (osobné zóny) a haptiku (dotyk). Často sa komunikuje v tesnej blízkosti, aby sa zabezpečili lepšie podmienky na odzveranie (Birka, Verešová, 2015). Poskytovanie zdravotnej starostlivosti osobám so sluchovým postihnutím má špecifické požiadavky, preto je potrebné prispôbiť sa ich preferenciám, individuálnym potrebám a komunikačným možnostiam, aby bola zabezpečená inklúzia pacienta. Komunikácia s touto skupinou pacientov je časovo náročná, ale realizovateľná. Dôležité je rešpektovať ich individuálne potreby a osobné preferencie. K odporúčaným zásadám komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím patrí: upútanie pozornosti, pomalá a zreteľná reč, používanie gest, mimiky a vizuálnych signálov, funkčnosť kompenzačných pomôcok, viditeľnosť tváre, trpezlivosť a ústretovosť, poskytnutie dostatočného času na odpoveď, opakovanie a preformulovanie, a využitie správnych technológií a pomôcok. Pri komunikácii sú preferované osobný kontakt a vizuálne pomôcky, pričom sestra by sa mala uistiť o porozumení poskytnutým informáciám (Graham et al., 2023).

Ciel' práce

Cieľom štúdie bolo identifikovať faktory ovplyvňujúce komunikáciu s osobami so sluchovým postihnutím v oblasti poskytovania zdravotnej starostlivosti, a na základe týchto zistení navrhnúť a zorganizovať edukačný program o základoch komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím pre študentov študijného programu ošetrovateľstva.

Metodika práce a výskumný súbor

Štúdiu sme realizovali v dvoch fázach – prvou bol zber údajov od špecifickej skupiny respondentov, t.j. osôb so sluchovým postihnutím a ich analýza, druhou aplikácia zistení a špecifických odporúčaní pre komunikáciu s osobami so sluchovým postihnutím do prípravy edukačného programu pre študentov ošetrovateľstva, analýza záujmu a potrieb študentov, a následná realizácia edukačného programu vo viacerých edukačných stretnutiach.

Na zber dát sme použili neštandardizovaný dotazník vlastnej konštrukcie, zostavený na základe preštudovanej literatúry a konzultácií s odborníkmi. Dotazník venoval pozornosť viacerým oblastiam z perspektívy osôb so sluchovým postihnutím: spôsob objednávanie na vyšetrenie, sprievod osôb so sluchovým postihnutím, spôsob komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím v zdravotníckych zariadeniach, porozumenie informáciám poskytovaným osobám so sluchovým postihnutím, problémy pri komunikácii a vyšetreniach, a demografické údaje. Odpovede na jednotlivé položky sa získavali prostredníctvom frekvenčnej škály (1 – nikdy, 2 – občas, 3 – často, 4 – veľmi často, 5 – vždy). Dotazník sme distribuovali v špecifickej skupine respondentov – osôb so sluchovým postihnutím – prostredníctvom občianskych združení a metódou snehovej gule. Využili sme skutočnosť, že jedna z autoriek štúdie je CODA (child of deaf adults – počujúce dieťa nepočujúcich rodičov) a zároveň osobná asistentka nepočujúcich, čo jej umožnilo nadviazať kontakt so skupinami nepočujúcich na Slovensku. Zber dát sme ukončili po vyčerpaní dostupných kontaktov. Výsledky sme spracovali v programe MS Excel 2016 pomocou deskriptívnych štatistických metód (priemer, medián, modus, minimum, maximum).

Výskumný súbor pre prvú fázu štúdie sme vybrali zámerným výberom so zaraďujúcimi kritériami: sluchové postihnutie, vek nad 18 rokov, súhlas s účasťou na výskume a spracovaním údajov. Štúdie sa celkovo zúčastnilo 53 respondentov so sluchovým postihnutím, z toho 35 žien a 18 mužov. Priemerný vek respondentov bol 38,2 roka, z hľadiska najvyššieho dosiahnutého vzdelania prevažovali respondenti so stredoškolským vzdelaním s maturitou. Pokiaľ ide o sluchové postihnutie, 22 respondentov malo sluchové postihnutie od narodenia a najvyšší vek jeho nadobudnutia v našom súbore respondentov bol 60 rokov.

Na základe výsledkov prvej fázy výskumu sme vytvorili edukačný program zameraný na základy komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím. Tento program sme plánovali začleniť do seminárov v rámci predmetu Výchova k zdraviu v prvom ročníku bakalárskeho štúdia ošetrovateľstva na Jesseniovej lekárskej fakulte Univerzity Komenského (JLF UK) v Martine. Pred realizáciou programu sme pomocou pološtruktúrovaného rozhovoru posúdili úroveň vedomostí študentov daného ročníka ($n = 51$), aby sme jednotlivé edukačné stretnutia prispôbili ich potrebám. Edukácia prebiehala v troch skupinách, pričom každé stretnutie trvalo 90 minút. Využívali sme kombináciu metód, ako sú rozhovor, výklad, demonštrácia a inštruktáž. Stretnutia viedla jedna z autoriek štúdie, CODA (child of deaf adults – počujúce dieťa nepočujúcich rodičov). Efektivitu programu, spokojnosť študentov s obsahom výučby a osvojenie si foriem komunikácie sme hodnotili priebežne, napríklad pozorovaním získaných zručností v posunkovej reči (praktické posunky), a na záver krátkym testom a formulárom spätnej väzby.

Po takomto pilotnom otestovaní edukačného programu sme ho ponúkli aj ďalším študentom zdravotníckych odborov na JLF UK, ktorí majú o uvedenú problematiku záujem. Nábor prebiehal prostredníctvom plagátov na vysokoškolskom internáte a na sociálnych sieťach. Prekvapil nás

mimoriadny záujem zo strany študentov. Preto sme sa rozhodli pokračovať v edukáciách až do zaradenia všetkých záujemcov. Týmto spôsobom sme uskutočnili ďalšie štyri edukačné stretnutia v priestoroch vysokoškolského internátu, vždy v skupinách do 20 študentov a v trvaní 90 minút.

Výsledky

V rámci interpretácie výsledkov sme sa zamerali na viacero oblastí súvisiacich s problematikou dorozumievania sa osôb so sluchovým postihnutím pri poskytovaní zdravotnej starostlivosti.

Čo sa týka spôsobu objednávanie na vyšetrenie, respondenti uvádzali ako najčastejšie využívané osobné objednávanie (priemer 2,89) a objednávanie cez internet (priemer 2,89), menej častým spôsobom bolo objednávanie cez SMS alebo online tlmočníka. Návštevy zdravotníckeho zariadenia realizovali osoby so sluchovým postihnutím nášho súboru najčastejšie bez sprievodu (priemer 3,25), občas v sprievode osoby ovládajúcej posunkovú reč (priemer 2,53), prípadne s osobným asistentom (priemer 2,23). V zdravotníckych zariadeniach respondenti často komunikovali písaním (priemer 3,04) alebo odčítaním z pier (priemer 3,06). Službu online tlmočníka využívali zriedkavo (priemer 1,79). K problémom pri porozumení informáciám poskytovaným zdravotníckym personálom respondenti najčastejšie uviedli nadmerné používanie odborných výrazov (priemer 3,15), rýchlu reč (priemer 3,11) a nedostatočný vizuálny kontakt (priemer 3,17). Osoby so sluchovým postihnutím nášho súboru uvádzali, že často odchádzali zo zdravotníckeho zariadenia bez úplného porozumenia tomu, čo im bolo povedané. Z ďalších problémov, ktoré vznikajú pri komunikácii so zdravotníckym personálom, respondenti uvádzali, že často nerozumejú sestrám kvôli prekrytým ústam (priemer 2,49) alebo nedostatočnej artikulácii (priemer 3,06). Taktiež deklarovali pocity, že zdravotnícky personál uprednostňuje počujúcich pacientov pred nepočujúcimi.

Efektívna komunikácia je dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje kvalitu poskytovanej zdravotnej starostlivosti a spokojnosť pacientov. Môže významne determinovať aj zdravotný a psychický stav pacienta.

Na základe vyhodnotenia odpovedí osôb so sluchovým postihnutím v našom súbore respondentov sme sa rozhodli navrhnuť edukačný program a realizovať edukáciu pre budúce sestry – študentky a študentov študijného programu ošetrovateľstvo.

Pred samotnou edukáciou sme považovali za dôležité posúdiť úroveň vedomostí študentov v oblasti komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím. Posúdenie sme realizovali formou pološtruktúrovaného rozhovoru so študentmi. Z odpovedí vyplynulo, že niektorí študenti sa už stretli s osobami so sluchovým postihnutím, no väčšina nevedela, ako s nimi správne komunikovať. Preferovali by písomnú komunikáciu, ktorú považovali za jednoduchú a spoľahlivú. Vedeli o existencii posunkového jazyka, no nepoznali jeho presný význam. Správne identifikovali odčítanie z pier ako vhodnú metódu komunikácie pre osoby so sluchovým postihnutím a zdôraznili tiež potrebu ovládania

základov posunkového jazyka, hoci ho nepovažovali za kľúčový pre svoju prax. Študenti vnímali starostlivosť o osoby so sluchovým postihnutím ako veľmi špecifickú, avšak ich poznatky sa sústreďovali najmä na základy komunikácie, ako je zabezpečenie pozornosti či udržanie zrakového kontaktu. Nepoukázali na ďalšie konkrétne aspekty zdravotnej starostlivosti, ktoré by zohľadňovali potreby pacientov používajúcich posunkový jazyk. Jedným z dôležitých odporúčaní v starostlivosti o nepočujúcich pacientov je minimalizácia zásahov do dominantnej ruky, ktorú primárne používajú na komunikáciu. Pri ošetrovateľských výkonoch a manipuláciách by sa preto mala uprednostňovať nedominantná horná končatina, aby si pacient mohol zachovať schopnosť efektívne posunkovať počas hospitalizácie alebo liečebného procesu.

Na základe zistení z individuálnych rozhovorov so študentmi a výsledkov dotazníka sme pripravili edukačný program a realizovali samotnú edukáciu. Edukačné stretnutia pozostávali zo štyroch častí: úvodnej, motivačnej, expozičnej a fixačnej. V úvodnej časti sme študentov oboznámili s priebehom edukácie. V motivačnej časti sme pomocou diskusie a brainstormingu rozoberali zásady komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím, kompenzačné pomôcky a špecifiká ošetrovateľskej starostlivosti. Expozičná a fixačná časť sa zameriavali na praktické zručnosti. Študenti dostali edukačný leták (obrázok 1), učili sa daktylotiku a praktické posunky, ktoré následne precvičovali.

ZÁSADY KOMUNIKÁCIE S OSOBAMI SO SLUCHOVÝM POSTIHNUTÍM:

- zabezpečiť pokojné, dobre osvetlené, ničím a nikým nerušené prostredie
- upútať pozornosť pred zahájením komunikácie
- udržiavanie očného kontaktu
- hovoriť pomaly s dôrazom na artikuláciu
- používať gestá, mimiku, vizuálne signály a pomôcky na podporu komunikácie
- ubezpečiť sa, že sú kompenzačné pomôcky funkčné a zapnuté
- pri komunikácii s osobami používajúcimi takéto pomôcky je vhodné postaviť sa na stranu, na ktorej je pomôcka umiestnená
- zabezpečiť dobrú viditeľnosť tváre a torza
- trpezlivosť a ústretovosť voči individuálnym potrebám a preferenciám
- poskytnúť dostatočný čas na odpoveď a zvoliť správnu rýchlosť komunikácie
- opakovať a podľa potreby preformulovať otázky/vety
- neklásť viac otázok naraz
- na otázky odpovedať hneď a stručne
- voliť jednoduchšiu vetnú stavbu a menej odborných slov
- snažiť sa porozumieť pacientovi



Komunikácia môže prebiehať písaním si prostredníctvom aplikácie, ale aj papiera. Hlavnou výhodou je možnosť uchovať si záznam konverzácie!

NEVIETE SA AJ TAK DOROZUMIEŤ S NEPOČUJÚCIMI?



ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV:

ABOU-ABDALLAH, M., et al., 2021. Exploring communication difficulties with deaf patients. In: *Clinical Medicine* [online]. 21(4), 380-383. DOI: 10.7861/clinmed.2021-0111

BRENNER, M. J., et al., 2018. Use of Interpreter Services in the Emergency Department. In: *Annals of Emergency Medicine* [online]. 72(4), 432-437. ISSN 0196-0644

Communicating With Deaf Individuals, 2023. In: *National Deaf Center on Postsecondary Outcomes* [online]. [cit. 2024-02-02]. Dostupné z: <https://nationaldeafcenter.org/resource-items/communicating-deaf-people/>

GRAHAM, L., et al., 2023. Strategies to Improve Emergency Department Care of the Deaf and Hard of Hearing Patient. In: *Journal of Emergency Nursing* [online]. 49(4), 489-494. ISSN 0099-1767

Prstová abeceda (tematická oblasť), 2024. In: *Posunky.sk* [online]. [cit. 2024-02-02]. Dostupné z: <https://www.posunky.sk/prstova-abeceda/to-106/>

Tips for effective Communication, 2020. In: *Deaf-Hearing Communication Centre* [online]. [cit. 2024-02-02]. Dostupné z: <https://dhcc.org/resources/communication-tips/>

VYTVORILA: MONIKA KUVIKOVÁ



JESSENOVA LEKÁRSKA FAKULTA
V MARTINE
Univerzita Komenského v Bratislave
Ústav ošetrovateľstva

SPRIEVODCA EFEKTÍVNOU KOMUNIKÁCIOU SO SLUCHOVO POSTIHNUTÝMI OSOBAMI

PRE ŠTUDENTOV
ZDRAVOTNÍCKYCH
ODBOROV







Edukačný leták pre študentov študijného programu Ošetrovateľstvo

Študenti prejavili veľký záujem o túto časť edukácie a všetci zvládli vyhláskovať svoje meno daktylotikou. Následne sme pokračovali inštruktážou a demonštráciou vopred pripravených posunkov týkajúcich sa praktických fráz, slov, slovných spojení a pojmov, s ktorých potrebou použitia by sa študenti mohli stretnúť počas svojej praxe pri kontakte s osobou so sluchovým postihnutím. Počas pripravených zážitkových cvičení a aktivít si prakticky vyskúšali odčítanie z pier a použitie rôznych foriem komunikácie, zameraných na kontakt a komunikáciu s osobami so sluchovým postihnutím v zdravotníckych zariadeniach.

Spätná väzba na uskutočnené edukačné stretnutia bola pozitívna, študenti oceňovali ich prínos, praktickú využiteľnosť, ako aj spôsob edukácie, ktorý im pomohol lepšie porozumieť komunikácii s osobami so sluchovým postihnutím. Mnohí zdôraznili potrebu začlenenia takejto edukácie do štandardného vzdelávania zdravotníckych pracovníkov.

Diskusia

Komunikácia medzi pacientom a zdravotníckym pracovníkom je v systéme poskytovania zdravotnej starostlivosti jedným z hlavných pilierov efektívnej a bezpečnej klinickej praxe. Do tohto systému vstupujú aj pacienti, ktorým zdravotné znevýhodnenie neumožňuje komunikovať so zdravotníckym personálom štandardným spôsobom, ako napríklad osoby so sluchovým postihnutím. Hlavným cieľom štúdie bolo poukázať na problém komunikácie pacientov so sluchovým postihnutím so zdravotníckym personálom, identifikovať faktory ovplyvňujúce komunikáciu s osobami so sluchovým

postihnutím v oblasti poskytovania zdravotnej starostlivosti, a následne, na základe týchto zistení, realizovať edukáciu pre študentov študijného programu ošetrovateľstva.

Uvedenú štúdiu považujeme za pilotnú v danej problematike. Jej limitácie neumožňujú úplnú generalizáciu výsledkov a zistení, keďže reflektujú perspektívu a skúsenosti osôb so sluchovým postihnutím výhradne nášho výskumného súboru, získané v kontexte systému poskytovania zdravotnej starostlivosti na Slovensku. V rámci zámerného výberu súboru respondentov našej štúdie musíme konštatovať, že kontaktovanie osôb so sluchovým postihnutím bolo značne komplikované, čo v konečnom dôsledku determinovalo aj výsledný počet respondentov, ktorí sa zapojili do štúdie. Môže to súvisieť aj s určitou uzavretosťou komunit nepočujúcich a nedoslýchavých, ako uvádzajú aj Sopczyk (2021) a Deaf Awareness (2024). Získané výsledky sme porovnávali prevažne so zahraničnými štúdiami, keďže podobné výskumy v Slovenskej republike absentujú.

Naša štúdia identifikovala niekoľko faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať komunikáciu s osobami so sluchovým postihnutím v pozitívnom alebo negatívnom zmysle. Osoby so sluchovým postihnutím preferujú objednávanie na vyšetrenie prostredníctvom rodinného príslušníka, osobne alebo cez internet. Na vyšetrenia často prichádzajú sami, pričom najčastejšie komunikujú prostredníctvom písaného textu alebo odčítaním z pier. Myers et al. (2022) vo svojej štúdii identifikovali ako najpreferovanejšiu metódu využitie služieb profesionálnych tlmočníkov, ktorí však boli dostupní iba 45 % respondentom. V niektorých krajinách majú ošetrojúci lekári alebo manažéri zdravotníckych zariadení zákonnú povinnosť zabezpečiť tlmočníka pre osoby so sluchovým postihnutím (Are Doctors or..., 2018). Na Slovensku však táto prax nie je bežná, najmä pre nedostatok kvalifikovaných tlmočníkov. Túto úlohu často preberajú osobní asistenti bez potrebnej kvalifikácie (Beňo et al., 2015; Récky, 2016). Autori Brenner et al. (2018) upozorňujú, že využívanie neškolených tlmočníkov predstavuje značné riziko, najmä v zmysle skreslenia komunikovaných informácií. Respondenti nášho výskumného súboru najčastejšie preferujú písomnú komunikáciu so zdravotníckym personálom, a to predovšetkým kvôli jej spoľahlivosti. Respondenti uvádzali časté problémy so vzájomným porozumením v komunikačnom procese ako významný faktor, ktorý ovplyvňuje komunikáciu s osobami so sluchovým postihnutím. Tieto ťažkosti môžu vyplývať z nedostatku vedomostí zdravotníckeho personálu o špecifických spôsoboch komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím. K nesprávnemu porozumeniu prispieva aj to, že zdravotnícky pracovník často nestojí tvárou v tvár pacientovi, neudržiava vizuálny kontakt, neartikuluje dostatočne alebo si neoveruje porozumenie podávaným informáciám (DeVault et al., 2011). Tieto zistenia boli potvrdené aj v našej štúdii, ktorá tiež ukázala, že mnoho respondentov má obavy z bližšieho informovania sa u zdravotníckych pracovníkov. Až 40 respondentov navyše uviedlo, že majú pocit, že personál často uprednostňuje počujúcich pacientov pred osobami so sluchovým postihnutím. Tsimpida et al. (2018) vo svojej štúdii odkazujú na viaceré publikácie, ktoré poukazujú na fakt, že nepočujúcim a nedoslýchavým osobám nie je

poskytovaná zdravotná starostlivosť, ktorá by bola dostačujúca, primeraná, rešpektujúca ich komunikačné potreby a etické princípy. Respondenti v danej štúdii opisovali ambulancie a nemocnice ako desivé a odstrašujúce prostredie, pričom lekárov a sestry hodnotili často ako netrpezlivých.

Na základe výsledkov štúdie sme navrhli edukačný program pre študentov ošetrovateľstva, ktorý má za cieľ informovať o špecifických aspektoch komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím. Program sa tiež zameriava na zvýšenie povedomia o tejto problematike a na praktický nácvik základných komunikačných zručností, ktoré študenti môžu využiť v budúcej praxi pri práci s touto skupinou pacientov. Navrhnutý edukačný program sme v priebehu akademického roka 2024/2025 realizovali v rámci 7 edukačných stretnutí so študentmi ošetrovateľstva a ďalších zdravotníckych odborov na JLF UK v Martine, pričom spolu sme takto vyškolili 113 študentov. Tento prístup nadväzuje na skúsenosti z iných krajín, kde bol posunkový jazyk už zaradený ako kurz do bakalárskeho štúdia ošetrovateľstva (Adade et al., 2023). Prostredníctvom tejto edukácie sme sa snažili zabezpečiť, aby budúce sestry a ďalší zdravotnícki pracovníci mali nielen primerané vedomosti a komunikačné schopnosti, ale aj empatiu a ochotu porozumieť osobám so sluchovým postihnutím a ich potrebám.

Záver

Výsledky štúdie ukázali, že osoby so sluchovým postihnutím čelia v zdravotníckych zariadeniach výrazným komunikačným bariéram. Medzi najčastejšie problémy patrí nadmerné používanie odborných výrazov zo strany zdravotníckeho personálu, rýchla reč, absencia možnosti odčítania z pier či nedostatok tlmočníkov posunkového jazyka, ktorých služby môže zdravotnícky systém využívať. Na základe identifikovaných nedostatkov sme pripravili edukačný program zameraný na požiadavky a princípy efektívnej komunikácie s osobami so sluchovým postihnutím, ktorý sme testovali u študentov ošetrovateľstva JLF UK v Martine. Táto intervencia v podobe pilotných edukačných stretnutí sa stretla so záujmom zo strany študentov a priniesla pozitívne výsledky v podobe zvýšeného povedomia a lepšieho porozumenia špecifikám starostlivosti o túto skupinu pacientov, vrátane komunikácie. Pre zlepšenie celkovej situácie a zaistenie efektívnej a bezpečnej starostlivosti o osoby so sluchovým postihnutím v klinickej praxi sú však nevyhnutné ďalšie, predovšetkým systémové opatrenia. Tieto by mali zahŕňať systematické vzdelávanie zdravotníckeho personálu zamerané na komunikáciu s touto skupinou pacientov, legislatívne úpravy v oblasti dostupnosti tlmočnických služieb a širšie využívanie moderných komunikačných technológií. Takéto opatrenia môžu výrazne prispieť k inkluzívnejšej a kvalitnejšej zdravotnej starostlivosti pre osoby so sluchovým postihnutím.

Použitá literatúra

- Adade R, et al. Perception of Ghanaian healthcare students towards the learning of sign language as course. *Cogent Public Health*. 2023 December; 10(1): 1-17.
- Are Doctors or Hospitals Required to Provide Interpreters for Deaf Patients and what are the penalties for not doing so? Disability Independence Group, Inc. 2018.
- Beňo P, et al. Bariéry, na ktoré narážajú ľudia so sluchovým postihnutím v Slovenskej republike. *Problemy edukacji, rehabilitacji i socjalizacji osób niepełnosprawnych*. 2015 21(2): 73-84.
- Birka P, Verešová J. Základy komunikácie s deťmi a žiakmi s poruchami sluchu. Bratislava: Metodicko-pedagogické centrum. 2015;56 s.
- Brenner M J, et al. Use of Interpreter Services in the Emergency Department. *Annals of Emergency Medicine*. 2018. October; 72(4), 432-437.
- Deaf Awareness. National Deaf Center on Postsecondary Outcomes. 2024.
- DeVault M, Garden R, Schwartz M A. Mediated Communication in Context: Narrative Approaches to Understanding Encounters between Health Care Providers and Deaf People. *Disability Studies Quarterly*. 2011;31(4).
- Graham L, et al. Strategies to Improve Emergency Department Care of the Deaf and Hard of Hearing Patient. *Journal of Emergency Nursing*. 2023 Jul;49(4):489-494.
- Myers J M, et al. Access to Effective Communication Aids and Services among American Sign Language Users across North Carolina: Disparities and Strategies to Address Them. *Health Communication*. 2022 Jul;37(8):962-971.
- Récky J, et al. Analýza potrieb komunity Nepočujúcich na Slovensku (interview nepočujúci a počujúci) – 2. časť. *Myslímovinky*. 2016;7(5):9-13.
- Slowík J. Speciální pedagogika. 2. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2016; 168 s.
- Sopczyk L D. Educating Learners with Disabilities and Chronic Illnesses. In: Bastable B S et al. *Nurse as Educator: Principles of Teaching and Learning for Nursing Practice*. 6. ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning. 2021;383-428.
- Tsimpida D, et al. Barriers to the use of health services among deaf and hard of hearing adults in Greece: a Cross-Sectional Study. In: *European Journal for Person Centered Healthcare*. 2018 December; 6(4), 638-648.
- Zákon č. 149/1995 Z.z. Zákon Národnej rady Slovenskej republiky o posunkovej reči nepočujúcich osôb.
- Zákon č. 151/2017 Z.z. Zákon, ktorým sa mení a dopĺňa zákon Národnej rady Slovenskej republiky č. 149/1995 Z. z. o posunkovej reči nepočujúcich osôb a ktorým sa mení a dopĺňa
- Zákon č. 447/2008 Z.z. o peňažných príspevkoch na kompenzáciu ťažkého zdravotného postihnutia a o zmene a doplnení niektorých zákonov.

Zákon č. 448/2008 Z.z. o sociálnych službách a o zmene a doplnení zákona č. 455/1991 Zb. o živnostenskom podnikaní (živnostenský zákon) v znení neskorších predpisov.

Konštrukcia plazmidov kódujúcich fluorescenčne označené nanoprotílátky (NbALFA) s afinitou k ALFA-tagu

Lučanský V.¹, Samec M.², Pěč M.², Pěčová R.^{1*}, Mazuchová, J.²

¹ Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

² Ústav lekárskej biológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

*korešpondenčný autor

prof. MUDr. Renata Pěčová, PhD., MPH

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Univerzita Komenského v Bratislave

Ústav patologickej fyziológie

Malá Hora 4C

036 01 Martin

tel: +421 43 2633 622 e-mail: renata.pecova@uniba.sk

Abstrakt

ALFA-tag v kombinácii so špecifickou anti-ALFA nanoprotílátkou predstavuje jeden z najlepších systémov označovania natívnych proteínov, so širokým uplatnením v biologických vedách. Keďže naším cieľom bolo vytvorenie modelu umožňujúceho vizualizáciu rozličných proteínov v reálnom čase a v živej bunke, navrhli sme a skonštruovali sériu plazmidových konštruktov, ktoré budú základom pre vytvorenie permanentných bunkových línií, produkujúcich NbALFA označených fluorescenčným proteínom.

Kľúčové slová ALFA tag, nanoprotílátkami/nanobody, fluorescenčné proteíny, plazmidy

Úvod

Rozličné epitopové tagy majú široké spektrum aplikácií v molekulárnej a bunkovej biológii, či už pri detekcii, manipulácii, alebo prečisťovaní proteínov. Jedným z najlepších epitopov je tzv. ALFA-tag, s minimálnou sekvenciou „SRLEEEELRRRLTE“, ktorý bol racionálne navrhnutý tak, aby v kombinácii so špecifickými nanoprotílátkami/nanobody (NbALFA) umožnil veľmi efektívne označovanie proteínov.

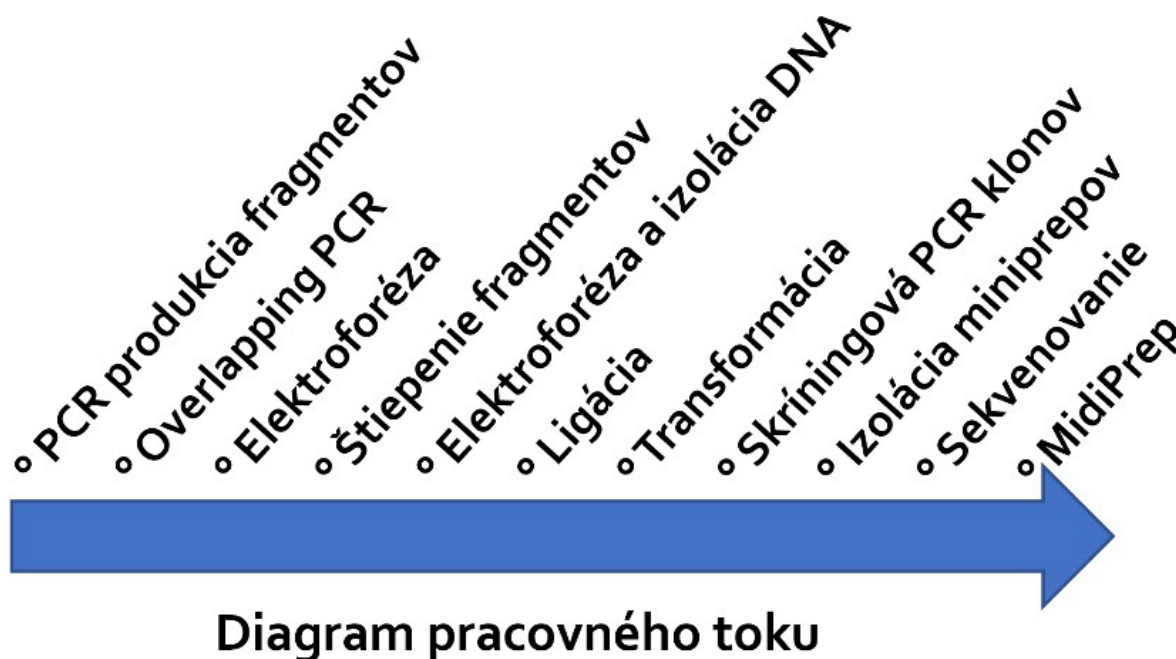
ALFA-tag tvorí malý a stabilný α -helix, ktorý je funkčný bez ohľadu na jeho polohu v cieľovom proteíne, či už u prokaryotických, alebo eukaryotických organizmov, funguje v natívnych aj fixovaných vzorkách, dokonca aj pri pikomolárnych množstvách. Ideálne sa hodí pre mikroskopiu s vysokým rozlíšením, imunoprecipitáciu a Western blotting, alebo in vivo detekciu proteínov, efektívne jednokrokové purifikácie natívnych proteínov, ich komplexov, a dokonca živých buniek.

Špecifické nanoprotilátky viažúce ALFA-tag boli pripravené imunizáciou lám alpák príslušným peptidom. Následne boli vyselektované NbALFA s optimálnou afinitou. Po komplexnom selekčnom procese bola vybraná sekvencia, ktorá bola ešte následne geneticky modifikovaná, tak aby umožnila napr. naviazanie fluoroforov (Götzke et al., 2019).

Pri našej práci na molekulárnych nástrojoch, umožňujúcich vizualizáciu dejov v reálnom čase a v živej (nefixovanej) bunke, sme došli k záveru, že využitie AFLA-tag systému by bolo pre nás prínosom. Preto sme navrhli a vytvorili sériu plazmidových konštruktov kódujúcich NbALFA spojených linkerom (3xGGS) s mNeonGreen (mNG) (Shaner et al., 2013), respektíve s mRFP680 (Matlashov ME, et al., 2020). Ako vektor boli použité lenti-plazmidy pHAGE, umožňujúce produkciu lentivírusového vektora, ktoré niesli buď hygromycínovú, alebo puromycínovú rezistenciu.

Materiál a metódy

Postup práce pri konštrukcii navrhnutých plazmidov je zobrazený na obrázku 1.



Obr. 1 Znáznornenie po sebe nasledujúcich krokov pracovného postupu.

° PCR produkcia DNA fragmentov

Na produkciu DNA fragmentov bola použitá DNA polymeráza s proof reading aktivitou Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermofisher). Protokol korešpondoval s odporúčaním výrobcu. Použité primery sú v zobrazené v tabuľke 1. Konkrétne: Na produkciu NbALFA boli použité: NbALFA-F a NbALFA /linker-R; na produkciu mNG: Linker/mNG-F a mNG-R a na produkciu miRFP68o: linker/miRFP68o-F a miRFP68o-R. Ako templát slúžili: pHAGE-puro-NbALFA-mScarlet, pcDNA3.3-Term-RS-mNG-PEST a pmiRFP68o-N1. Na samotnú amplifikáciu bol použitý nasledujúci program: Iniciačná denaturácia: 98°C, 1 min; nasledovaná 35 cyklami: denaturácia – annealing - elongácia: 98 °C, 10 sec. - 55 °C, 20 sec. - 72 °C, 3 min. Potom finálna elongácia 72 °C, 10 min. a chladenie na 4 °C až do vybratia PCR produktov.

Názov primeru	Sekvencia primeru
NbALFA-F	GAAGCGGCCGCCACCATGGGCTCTGGTGATGCATCTG
NbALFA /linker-R	GGAACCACCAGAACACCAGAACCTCCGGTTGCGACGTTTTCCCCAGTGG
Linker/mNG-F	GGAGGTTCTGGTGGTTCTGGTGGTTCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC ATG
mNG-R	GAGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCCCATC
linker/miRFP68o-F	GGAGGTTCTGGTGGTTCTGGTGGTTCCGCGGAAGGCTCCGTCGCCAGGCAG C
miRFP68o-R	GAGGGATCCTTACTCTTCCATCACGCCGATCTGAGTG
pHAGE-seq-F	TCTCAAGCCTCAGACAGTGG
pHAGE-seq-R	ACGCACACCGGCCTTATTCC

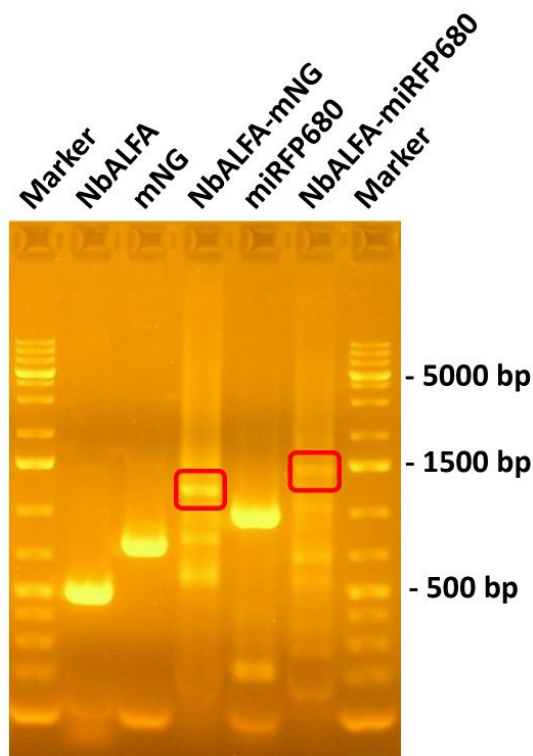
Tab. 1 Zoznam a sekvencie primerov použitých pri konštruovaní plazmidov.

° Overlapping PCR

Produkty prvej PCR boli následne použité ako templát pre overlapping PCR. Vyprodukované PCR fragmenty boli navrhnuté tak, aby sa 3' koniec NbALFA sekvencie prekryval s 5' koncom mNG, respektíve miRFP68o fragmentu. Pri použití iba F-primeru pre NbALFA a R-primeru pre mNG, respektíve miRFP68o, dochádza k preferenčnému pomnoženiu úsekov, ktoré sa spojili a vytvorili tak sekvenciu, ktorá je ohraničená F- aj R-primerom. Podmienky aj materiál pre overlapping PCR boli zhodné s prvou PCR. Produkty týchto reakcií boli NbALFA-mNG a NbALFA-miRFP68o.

° Gélová elektroforéza

Kontrola a analýza produktov PCR a overlapping PCR bola urobená pomocou gélovej elektroforézy (Obr. 2). Bol použitý 1,5% agarózový gél (TopVision Agarose, Thermofisher) a DNA marker: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermofisher).



Obr. 2 Gélová elektroforéza produktov PCR a overlapping PCR. Fragmenty v červených rámčekoch predstavujú vzniknutý produkt overlapping PCR, ktorý vznikol po spojení 2 sekvencií a tie boli následne použité na konštrukciu navrhnutých plazmidov.

° Restrikčné štiepenie fragmentov a vektorov

Pri produkcii fragmentov NbALFA-mNG a NbALFA-miRFP680 boli použité primery s predpripravenými restrikčnými miestami NotI a BamHI, ktoré sa nachádzajú aj vo vektore pHAGE. NbALFA-mNG a NbALFA-miRFP680 boli teda naštípené pomocou NotI a BamHI (Thermofisher), navyše boli ošetrené metylačne senzitívnym enzýmom DpnI (Thermofisher), ktorý odstránil plazmidové templáty. Analogicky bol pomocou NotI a BamHI restrikčných enzýmov naštípený plazmid pHAGE, zároveň bol ošetrený alkalickou fosfatázou (FastAP, Thermofisher), ktorá zabráni opätovnému spojeniu prázdneho vektora pomocou ligázy.

° Vyrezanie a izolácia z gélu

Naštípené modifikované PCR fragmenty a vektor boli separované pomocou gélovej elektroforézy s použitím tzv. LMT agarózy (2%) (Low-melt Agarose, Biotech), ktorá umožňuje efektívnejšiu izoláciu z gélu. Potom bol DNA band správnej veľkosti vyrezaný a izolovaný pomocou kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Biotech), a to podľa protokolu odporúčaného výrobcom.

° Ligácia

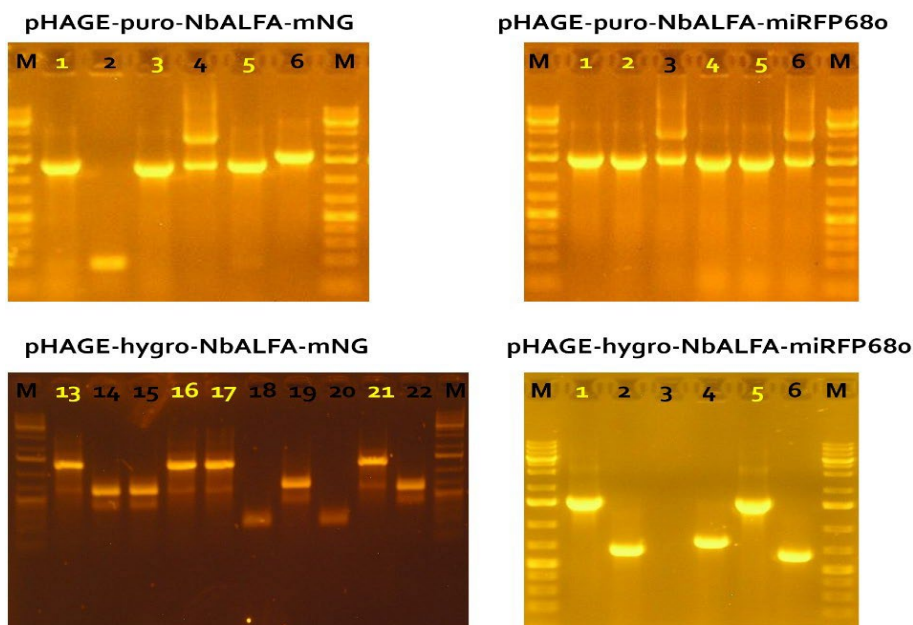
Opracované a prečistené DNA fragmenty a vektor boli následne spojené pomocou ligázy (Rapid ligation kit, Thermofisher). Bol použitý protokol odporúčaný výrobcom. Inkubácia prebehla pri 22°C cez noc.

° Transformácia

Ligačná zmes bola transformovaná do chemicky kompetentných baktérií Stbl3 (One Shot Stbl3 Comp E. Coli, Thermofisher), pomocou heat shock protokolu odporúčaného výrobcom. Stbl3 baktérie znižujú percento rekombinácií a teda sú vhodné aj na klonovanie do lenti-vektorov. Transformované baktérie boli nanesené na agarové misky a inkubované cez noc v 37°C.

° Skriningová PCR

Vybrané bakteriálne klony boli testované na prítomnosť žiadúcich DNA konštruktov pomocou PCR skriningu. PCR kit Go Taq G2 Green Master Mix (Lambda) v kombinácii s primermi pHAGE-seq-F a pHAGE-seq-R (Pozri tabuľku 1) boli použité podľa odporúčaní výrobcu. Na amplifikáciu bol použitý program: Iniciačná denaturácia: 98°C, 5 min; nasledovaná 35 cyklami: denaturácia – annealing – elongácia: 98 °C, 10 sec. – 55 °C, 20 sec. – 72 °C, 40 sec. Potom finálna elongácia 72 °C, 5 min. a chladenie na 4 °C až do vybratia PCR produktov. Analýza produktov skriningovej PCR bola urobená pomocou gélovej elektroforézy (Obr. 3), za podobných podmienok ako pri PCR na produkciu fragmentov.



Obr. 3 Gélková elektroforéza s produktmi skríningovej PCR. Žltými písmenami sú zvýraznené čísla klonov s PCR fragmentom očakávanej veľkosti.

° Miniprep

Klony, ktoré vykázali pozitívny signál, teda band v očakávanej veľkosti, boli nasadené do 2 ml LB média s antibiotikom a inkubované cez noc v trepačke pri 37°C a 400 RPM. Z vyrastenej bakteriálnej suspenzie bola vyzisovaná plazmidová DNA pomocou kitu Purelink Quick Mini (Thermofisher), podľa odporúčaní výrobcu. Časť živej bakteriálnej suspenzie bola zmiešaná v pomere 1:1 s glycerolom a uložená pri -80 °C ako bakteriálny štok.

° Sekvenácia

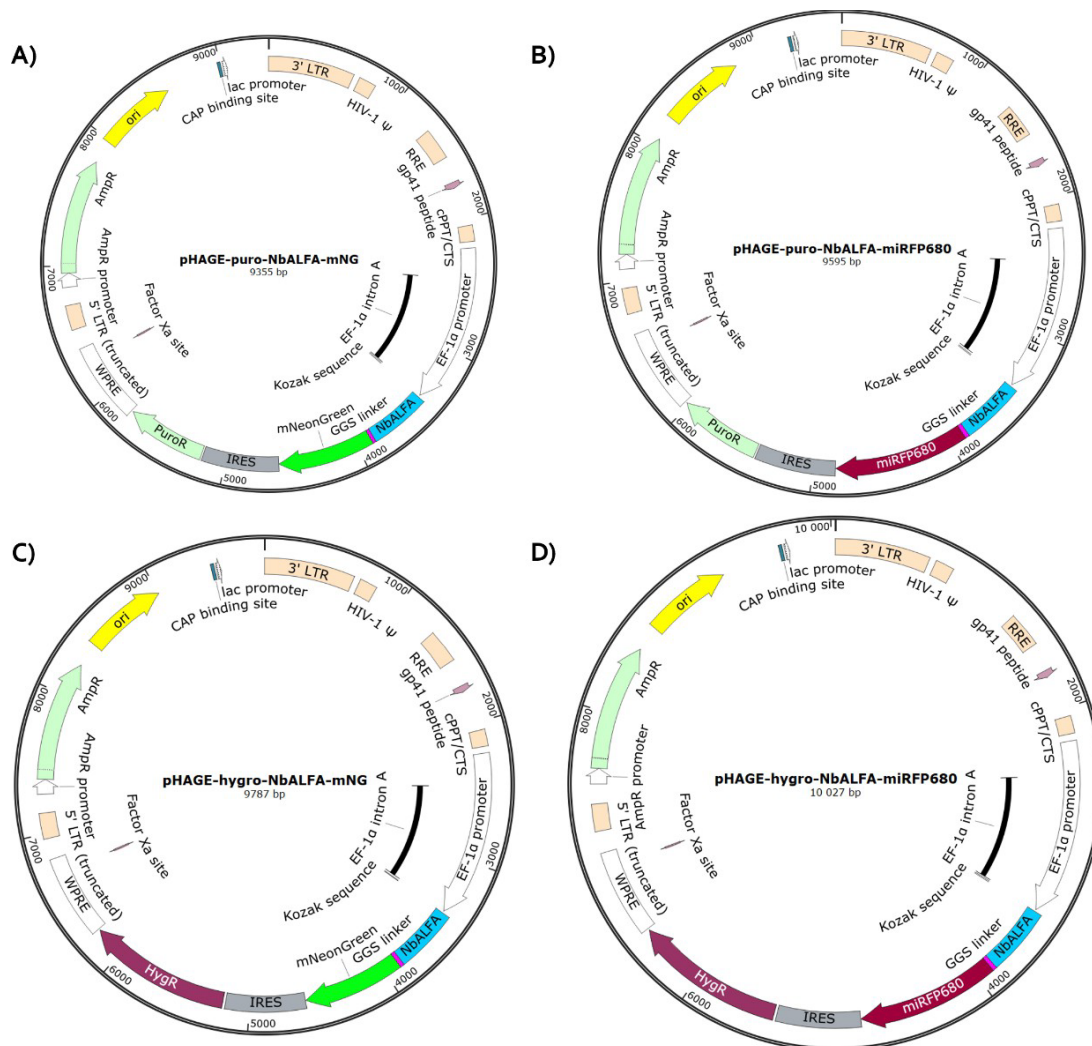
Vybrané klony boli následne osekvenované s využitím primerov pHAGE-seq-F a pHAGE-seq-R (sekvencia primerov je zobrazená v tabuľke 1.), pomocou sekvenačného kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermofisher). Získané sekvencie boli analyzované softvérom Chromas 2.5.

° Midiprep

Na finálnu prípravu skonštruovaných a sekvenovaných overených plazmidov v žiadúcej čistote a koncentrácií bol použitý NucleoBond Xtra Midi kit (Biotech). DNA bola izolovaná z 50 ml bakteriálnej suspenzie v LB s ampicilínom, podľa odporúčaní výrobcu.

Výsledky

Pomocou vyššie uvedeného protokolu boli zostrojené nasledujúce konštrukty: pHAGE-puro-NbALFA-mNG, pHAGE-puro-NbALFA-miRFP68o, pHAGE-hygro-NbALFA-mNG, pHAGE-hygro-NbALFA-miRFP68o. Podrobnosti sú zobrazené na obrázku 4.



Obr. 4 Mapy konštruktov: A) pHAGE-puro-NbALFA-mNG, B) pHAGE-puro-NbALFA-miRFP680, C) pHAGE-hygro-NbALFA-mNG, D) pHAGE-hygro-NbALFA-miRFP680

Ide o sériu plazmidov, z ktorých každý kóduje anti-ALFA nanoprotiľátky označené buď zeleným fluorescenčným proteínom mNG, alebo infračerveným fluorescenčným proteínom miRFP680. Jednotlivé plazmidy sú pomnožiteľné v baktériách, ktoré majú zníženú rekombinačnú aktivitu, napr. Stbl3. Už v epizomálnej forme sú schopné expresie v eukaryotických bunkách, ale predovšetkým je možné pomocou nich vyprodukovať lenti-vektory, ktoré dokážu integrovať nesenú informáciu do genómu eukaryotov. Pre selekciu v eukaryotoch nesú jednotlivé plazmidy buď hygromycínovú, alebo puromycínovú rezistenciu.

Diskusia

Potenciálne uplatnenie ALFA tag systému v rozličných podoblastiach biológie, vrátane komplexných mikroskopických techník je extrémne široké (Potlapalli, et al. 2024; Stover L, et al., 2024; Rudd-Schmidt JA, et al., 2022; Akhuli D, et al., 2022). Pripravené konštrukty nám rozšírili možnosti použitia jednotlivých vlnových dĺžok pri plánovaní experimentov na zelené a infračervené vlnové dĺžky, keďže pôvodný konštrukt, z ktorého sme vychádzali bol v oblasti oranžového spektra (pHAGE-puro-NbALFA-mScarlet).

Vyprodukované plazmidy budú následne použité pre tvorbu lentivírusových vektorov a po transdukcii na tvorbu permanentných bunkových línií, ktoré umožnia mikroskopické pozorovania proteínov nášho záujmu, označených ALFA-tagom. Protokol na pridávanie ALFA-tagu, či už na N, alebo C koniec proteínu, máme v laboratóriu zoptimalizovaný a plne funkčný.

Niektoré bunkové línie, ktoré boli vygenerované s použitím vyššie opísaných konštruktov už boli použité v experimentoch zameraných buď na popisovanie tvorby a transportu extracelulárnych vezikúl (Bare Y, 2025), alebo popisovanie prieniku SARS-CoV-2 viriónov do permissívnej bunky (Lebrun S, 2025). Aj tieto naše výsledky poukazujú na vysokú verzatilitu, praktickosť a funkčnosť ALFA-tag systému.

Financovanie

Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore grantu VEGA 1-0261-22: Príprava molekulových nástrojov umožňujúcich sledovanie časovo-priestorovej dynamiky vstupu SARS-CoV-2 do bunky pomocou 3D mikroskopie s vysokým rozlíšením a v reálnom čase.

Použitá literatúra

- Götzke H, Kilisch M, Martínez-Carranza M, et al. The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat Commun.* 2019 Sep 27;10(1):4403.
- Shaner NC, Lambert GG, Chammas A, et al. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods.* 2013 May;10(5):407-9.
- Matlashov ME, Shcherbakova DM, Alvelid J, et al. A set of monomeric near-infrared fluorescent proteins for multicolor imaging across scales. *Nat Commun.* 2020 Jan 13;11(1):239.
- Potlapalli BP, Fuchs J, Rutten T, et al. The potential of ALFA-tag and tyramide-based fluorescence signal amplification to expand the CRISPR-based DNA imaging toolkit. *J Exp Bot.* 2024 Oct 30;75(20):6244-6257.
- Stover L, Bahramimoghaddam H, Wang L, et al. Grafting the ALFA tag for structural studies of aquaporin Z. *J Struct Biol X.* 2024 Feb 2;9:100097.

Rudd-Schmidt JA, Laine RF, Noori T, et al. ALFA-PRF: a novel approach to detect murine perforin release from CTLs into the immune synapse. *Front Immunol.* 2022 Dec 22;13:931820.

Akhuli D, Dhar A, Viji AS, et al. ALIBY: ALFA Nanobody-Based Toolkit for Imaging and Biochemistry in Yeast. *mSphere.* 2022 Oct 26;7(5):e0033322.

Bare Y, Delalande F, Hirschler A, et al. A proximity labeling reporter to track the endosomal origin of extracellular vesicles, v revízií, 2025

Lebrun S, Cogrossi G, Gorda B, et al., Generation of reporter virions and virus-like particles reveals the spatiotemporal mechanistic of SARS-CoV-2 penetration into cells, v príprave, 2025

Leptín ako uremický solút u dialyzovaných pacientov (pôvodná práca)

Hudecová S¹, Stančík M.¹

¹I. Interná klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Chronická choroba obličiek je celosvetovo jedným z najpálčivejších medicínskych problémov súčasnosti. Tento projekt prezentuje exploratívnu štúdiu realizovanú na 82 pacientoch rozdelených na kontrolnú podskupinu tvorenú 50 nedialyzovanými pacientami prijatými za účelom realizovania koronarografického vyšetrenia a 32 dialyzovanými pacientami v cieľovej podskupine. Primárnym cieľom bolo overiť zaradenie leptínu medzi uremické toxíny a objasniť vplyv parametrov adekvátnosti dialýzy na jeho koncentrácie. Sekundárnym cieľom je objasnenie vzťahu glomerulárnej filtrácie s hladinou leptínu. V prípade leptínu sme nepozorovali štatisticky významné zvýšenie hladiny leptínu. Regresná analýza získaných dát potvrdila inverznú asociáciu leptinémie s parametrom adekvátnosti dialýzy Kt/V, pričom táto asociácia bola viazaná na ženské pohlavie. Asociácia glomerulovej filtrácie s leptinémiou bola inverzná.

Kľúčové slová: Leptín; Dialýza; Uremický solút; Uremický toxín.

Úvod

Leptín je široko distribuovaný v rôznych tkanivách a je vylučovaný hlavne obličkami (1). Úloha obličiek v klírense hladín leptínu súvisí s eleváciou hladín leptínu u pacientov s poškodením obličiek a aj u pacientov s chronickou chorobou obličiek (2). Už v roku 1999 bol objavený účinok leptínu ako promotora syntézy transformujúceho rastového faktora β_1 , ktorý sa spolupodieľa na rozvoji hypertrofických a sklerotických zmien obličiek v teréne diabetickej nefropatie (3, 4). Otázny je vplyv leptínu na mortalitu pacientov v chronickom hemodialyzačnom programe. Doteraz publikované štúdie v tomto ohľade prinášajú kontradiktórne závery (5, 6, 7).

Súbor pacientov a metódy

Štúdia je exploratívna s transversálnym dizajnom. Dovedna 82 subjektov bolo zaradených do cieľového ramena tvoreného 32 dialyzovanými pacientami a do kontrolného ramena tvoreného celkovo 50 nedialyzovanými kontrolami indikovanými na invazívne koronarografické vyšetrenie. V skupine kontrol boli zahrnutí aj pacienti so známou CKD G1 – G3b, bez akútneho poškodenia obličiek. U každého pacienta v cieľovom ramene sa tesne pred realizáciou dialýzy odobrali vzorky

krvi v rámci pravidelných mesačných laboratórnych kontrol. Z týchto vzoriek krvi boli pomocou ELISA kitov stanovené ranné koncentrácie leptínu pomocou ELISA kit-u DRG EIA-2395. U každého pacienta v cieľovom ramene sme zistili hodnotu Kt/V pomocou automatizovaného systému merania založeného na ureovej kinetike prostredníctvom systému integrovaného v dialyzačnom monitore a vypočítali sme výšku ultrafiltrácie za jeden týždňový dialyzačný cyklus, na konci ktorého sme realizovali odber krvi na stanovenie koncentrácie leptínu. Suchú hmotnosť sme u každého dialyzovaného pacienta objektivizovali na princípe impedančného merania telesnej kompozície, pričom meranie nebolo ani v jednom prípade staršie ako 3 mesiace.

U každého pacienta v kontrolnom ramene bola v deň koronarografického vyšetrenia ráno po prebudení sa odobratá vzorka krvi, z ktorej sme koncentrácie leptínu stanovovali pomocou identických ELISA testov, ako v prípade cieľovej podskupiny. Všetky vzorky krvi boli okamžite po odobratí centrifugované za účelom separácie plazmy. Vzorky plazmy boli následne hlboko zmrazené. K rozmrazeniu vzoriek došlo bezprostredne pred ich spracovaním presným postupom stanoveným v manuáloch predmetných ELISA kitov. U subjektov v kontrolnom ramene sme merali hodnotu kreatinínu a pomocou rovnice MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) sme vypočítali hodnotu klírensu kreatinínu.

Analýzy výsledkov sme realizovali s pomocou IBM SPSS Statistics v. 25.0. Všetky skúmané kontinuálne premenné sme testovali na prítomnosť normálnej distribúcie za použitia Shapiro-Wilkovho testu a vizuálnej inšpekcie kvantilových diagramov. K problematike normalizácie sme pristupovali v zmysle platnosti centrálnej limitnej vety konzervatívne, to znamená iba v prípade nevyhnutnosti. Normalizácia premenných bola realizovaná prostredníctvom transformácie umocnením a transformácie prirodzeným logaritmom. Pri výpočte štatistickej významnosti diferencií priemerných hodnôt meraných kontinuálnych premenných t-testom sme prostredníctvom Levenovho testu zisťovali nehomogenitu variancií. V prípade narušenia predpokladu homogenity variancií sme na kompenzáciu pri meraní štatistickej významnosti rozdielov priemerov použili Welchovu mutáciu t - testu. V prípade porovnávania binomiálnych premenných použitý bol chí - kvadrátový test.

Vplyv kontinuálnych a nominálnych nezávislých premenných na binomiálnu závislú premennú sme analyzovali prostredníctvom binomiálnej logistickej regresie. Predpoklad linearity sme testovali pomocou Box-Tidwellovej procedúry s následnou Bonferroniho adjustáciou alfa úrovni. Vhodnosť modelu bola posúdená pomocou Hosmerovho - Lemeshowho testu.

Súvislosť medzi kontinuálnou dependentnou premennou a kontinuálnymi a binomiálnymi prediktormi sme zisťovali pomocou postupného mnohopočetného lineárneho regresného modelovania s doprednou selekciou premenných. Autokoreláciu sme detekovali Durbinovým-Watsonovým testom. Linearitu v modeli sme overovali observáciou rozptylového diagramu

studentizovaných rezíduí voči neštandardizovaným predikovaným hodnotám pre celý test ad hoc a aj osobitne observáciou rozptylových diagramov jednotlivých kontinuálnych premenných voči dependentnej premennej. Podmienku homoskedastickosti sme overovali observáciou identického rozptylového diagramu studentizovaných rezíduí voči neštandardizovaným predikovaným hodnotám, ako v prípade overovania predpokladu linearity. V prípade porušenia podmienky homoskedastickosti sme postupovali metódou váženej regresie najmenších štvorcov (weighted least square regression_{ang.}). Kolinearitu sme testovali výpočtom faktora inflácie variance. Neobvyklé body sme vylúčili výpočtom Cookovej vzdialenosti a pákového koeficientu. Pri konštrukcii lineárnych regresných modelov sme použili techniku doprednej eliminácie neefektívnych prediktorov. Vzhľadom na relatívne malý počet prípadov a na celkový cieľ realizácie regresných modelov (detekcia asociácie a jej smer a nie hľadanie zástupných parametrov predikcie dependnetných premenných) sme vo výsledkoch regresných analýz neuvádzali presné hodnoty B koeficientov, ale ich 95 % konfidenčné intervaly.

Výsledky

Pomocou Welchovho t-testu sme medzi cieľovou a kontrolnou podskupinou nedokázali štatisticky významné rozdiely v jeho koncentrácii. Deskriptívne štatistický opis základných skúmaných charakteristík cieľovej a kontrolnej podskupiny a p-hodnoty príslušných štatistických testov sú v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Premenná	Kontrolná skupina	Cieľová skupina	Hladina významnosti (Studentov/Welchov t-test; Chí kvadrátový test)
Pohlavie	Muži: 13 Ženy: 37	Muži: 20 Ženy: 12	p < 0,001
Diabetes mellitus	Áno: 10 Nie: 40	Áno: 15 Nie: 17	p < 0,001
Vek	60,8 ± 8,1	63,4 ± 12,4	p = 0,309
Leptín (ng/mL)	18,08 ± 16,70	27,40 ± 30,30	p = 0,429
eGFR (mL/min/1,73m ²)	76,00 ± 18,07	-	-
Kt/V	-	1,475 ± 0,316	-
Ultrafiltrácia/týždeň (L)	-	8,31 ± 4,89	-

Za účelom detekcie súvislosti medzi hodnotou eGFR a leptinómiou sme skonštruovali mnohopočetný lineárny regresný model. Dependentnou premennou bola plazmatická koncentrácia leptínu, prediktory boli vek, pohlavie, diabetes mellitus a hodnota eGFR. Durbinov-Watsonov test nepreukázal prítomnosť autokorelácie v našom modeli ($D-B = 2,032$). Observáciou rozptylových diagramov sme potvrdili linearitu vzťahu kolektívne medzi všetkými prediktormi a aj medzi jednotlivými kontinuálnymi prediktormi a leptinómiou zvlášť, avšak zistili sme porušenie podmienky homoskedasticity, preto sme v ďalšej analýze pokračovali s použitím techniky váženej regresie najmenších štvorcov.

V analyzovaných dátach sa nenachádzal ani jeden štatisticky významný vplyvný, či pákový bod. Výsledný regresný model štatisticky významne predikoval leptinómiu ($F(4,42) = 21,26$; $p < 0,001$; $Adj.R^2 = 0,638$), pričom eGFR a pohlavie boli štatisticky signifikantné kontribútory. Súhrnná štatistika regresného modelu je uvedená v tabuľke 2.

Tabuľka 2
Koeficienty^{a,b}

Model		Štandard. koeficienty			95 % konfidenčný interval pre B	
		Beta	t	Sig.	Spodný	Horný
1	(Konštanta)		-1,209	,233	-30,835	7,733
	Vek	-,090	-,854	,398	-,385	,156
	Glomerulová filtrácia	,273	2,472	,018	,028	,279
	Pohlavie	,665	5,572	,000	5,724	12,224
	Diabetes mellitus	,160	1,734	,090	-,776	10,270

a. Dependentná premenná: Leptín

b. Vážená regresia najmenších štvorcov

Napokon sme skonštruovali lineárny regresný model závislosti leptinémie od parametrov adekvátnosti dialýzy a premenných Vek, Diabetes mellitus a pohlavie. Postupovali sme metódou doprednej eliminácie modelových atribútov. Výsledný model zahŕňajúci premenné pohlavie a Kt/V bol štatisticky významný ($F(2,29) = 9,204$; $p < 0,001$; $Adj. R^2 = 0,346$). Súhrnná štatistika modelu je uvedená v Tabuľke 3.

Tabuľka 3
Koeficienty^{a,b}

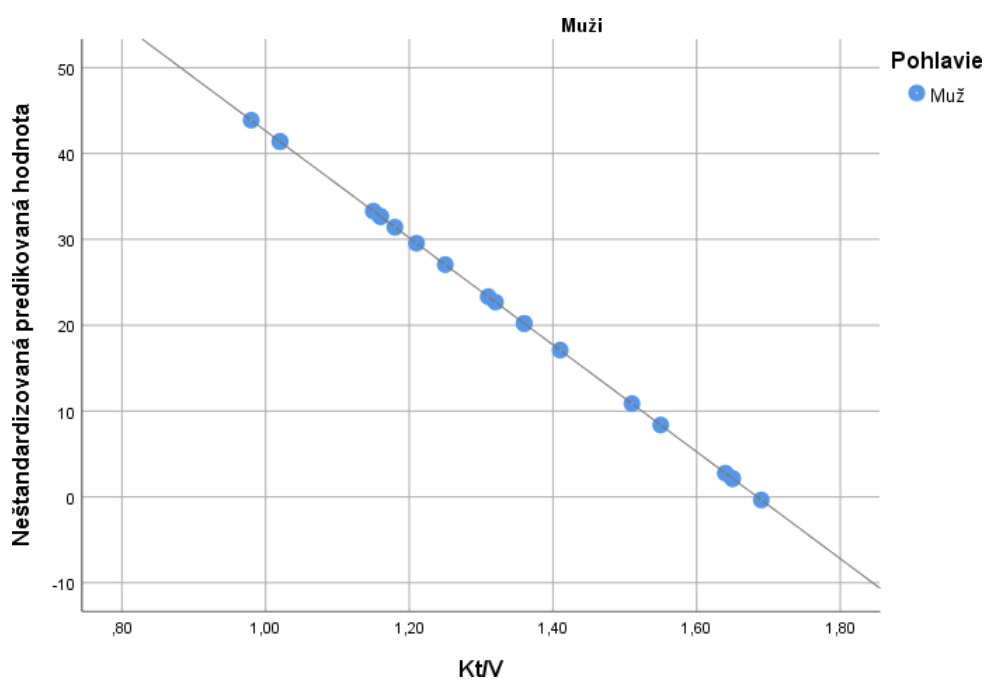
Model	Beta	Štandard. koeficienty		95 % konfidenčný interval pre B	
		t	Sig.	Spodný	Horný
2. krok		3,417	,002	26,684	106,251
Kt/V	-,782	-4,009	,000	-94,056	-30,512
Pohlavie (ženy)	,744	3,814	,001	17,832	59,062

a. Dependentá premenná: Leptín

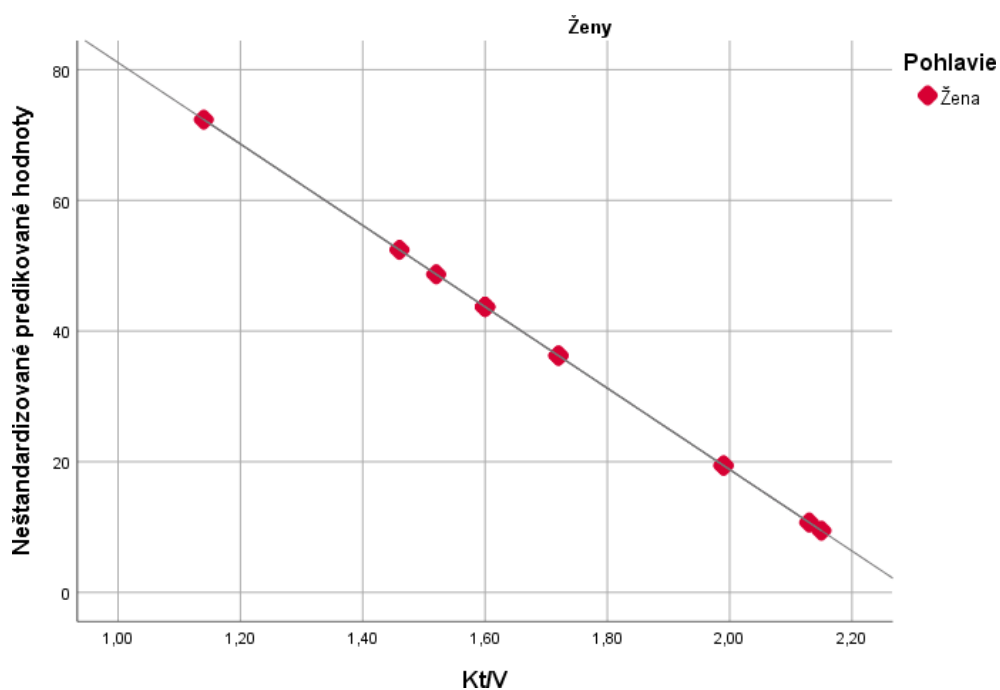
b. Vážená regresia najmenších štvorcov

Rozdiely v predikovaných hodnotách leptínémie pomocou Kt/V u mužského a ženského pohlavia zvlášť sú vizualizované v obrázkoch 1 a 2.

Obrázok 1

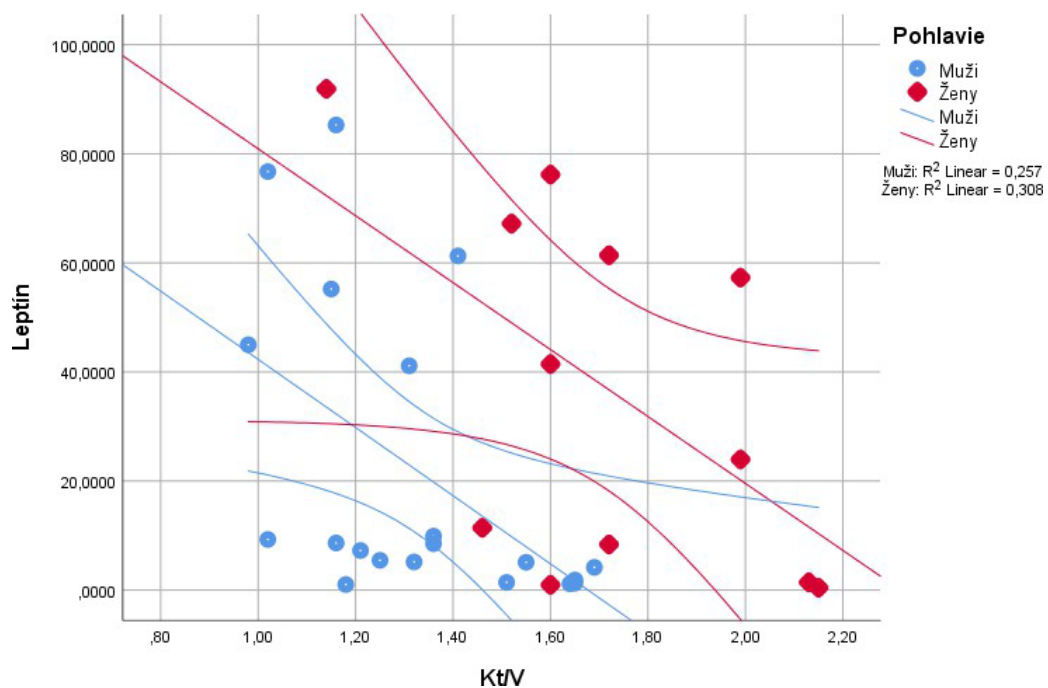


Obrázok 2



Regresné čiary váženej regresie najmenších štvorcov s vyznačenými 95 % konfidenčnými intervalmi, zvlášť pre jednotlivé pohlavia, vo vzťahu k reálne pozorovaným hodnotám leptinémie sú znázornené na obrázku 3.

Obrázok 3



Diskusia

V prípade leptínu tak deskriptívne - štatistické, ako aj analytické postupy nezistili asociáciu hyperleptinémie a chronickej dialýzy. Treba však poznamenať, že cieľová podskupina bola tvorená iba 32 pacientami a jej rozdelenie na podklade úrovni biomiálnych premenných v regresnom modeli zákonite viedlo k nadmernej kompartmentalizácii modelu, ktorého dôsledkom je spravidla zvýšenie detekčného prahu zachytenia existujúcej asociácie. Z vizuálneho porovnania hodnôt leptinémie medzi kontrolným a cieľovým súborom vyplýva, že pozorované leptinémie boli u dialyzovaných pacientov vyššie, aj keď prah štatistickej významnosti nebol prekročený. Hodnota smerodajnej odchýlky leptinémie v cieľovom súbore vyššia ako je priemerná hodnota leptinémie môže byť prejavom existencie takej interakcie, ktorá v relatívne malom cieľovom súbore asociáciu leptinémie s chronickou dialyzačnou liečbou maskuje. Tento predpoklad potvrdzuje výsledok lineárnej regresnej analýzy predikcie leptinémie u nedialyzovaných kontrol. Z tejto analýzy vyplýva, že prítomnosť ženského pohlavia je zásadným spôsobom asociovaná s vyššou leptinémiou. Vyššie koncentrácie leptínu u ženského pohlavia sú dobre známym faktom už viac ako dve desaťročia (8).

Z deskriptívne štatistického porovnania kontrolnej a cieľovej podskupiny vyplýva, že percentuálne zastúpenie žien u kontrol bolo štatisticky významne vyššie ako v cieľovej podskupine. Práve nerovnomernosť zastúpenia pohlaví medzi cieľovou a kontrolnou podskupinou by v našom súbore mohla byť faktorom maskujúcim asociáciu leptinémie s chronickou dialyzačnou liečbou. Podobne by úlohu mohla zohrávať aj nerovnomernosť zastúpenia diabetikov. V tomto prípade naše dáta ale neukázali očakávanú asociáciu leptinémie a prítomnosti diabetes mellitus. Tu však treba zdôrazniť, že naše regresné analýzy nezohľadňovali vplyv jednotlivých modalít liečby diabetes mellitus na koncentrácie skúmaných adipocytokínov. Analyzované dáta ukázali existenciu inverznej asociácie medzi hodnotou leptinémie a eGFR v kontrolnej podskupine.

Analýza vzťahu leptinémie a parametrov adekvátnosti dialýzy ukázala, že jedine hodnota Kt/V a nie hodnota UFw mala vplyv na leptinémiu, pričom táto asociácia bola inverzná. V tomto prípade môže teoreticky ísť o výsledok vplyvu asociácie obezity s vyššími hodnotami leptinémie, u ktorých môžeme hypoteticky predpokladať nižšie dosiahnuté hodnoty Kt/V. Nakoľko ale merania suchej hmotnosti vo veľkej väčšine prípadov neboli realizované v čase odberov vzoriek krvi, suchú hmotnosť sme do našich analýz ako premennú nezahrnuli. Na základe vizualizácie regresných čiar váženej regresie najmenších štvorcov pre jednotlivé pohlavia zvlášť možno konštatovať, že asociácia Kt/V a leptinémie je u podskupiny mužov vzhľadom na disperziu jednotlivých prípadov veľmi pochybná, hoci diagnostiky prítomnosti pákových bodov formálne nepotvrdili ich prítomnosť. Rozdelenie kohorty tvorenej 32 prípadmi na dve podskupiny je už zo štatistického hľadiska nevyhnutné hodnotiť ako nadmernú kompartmentalizáciu dát.

Záver

V prípade leptínu sme základnými deskriptívne štatistickými metódami u dialyzovaných pacientov nezistili štatisticky významne zvýšené koncentrácie. U nedialyzovaných pacientov sme ďalej dokázali inverznú asociáciu eGFR s leptinémiou. Analýzou dát v kontrolnej podskupine sme zistili asociáciu ženského pohlavia so zvýšenou leptinémiou. Tento vzťah vzhľadom na malý rozsah cieľovej podskupiny nebolo možné zohľadniť pri regresnej analýze vzťahu leptinémie a parametrov adekvátnosti dialýzy a mohol byť faktorom maskujúcim charakter leptínu ako uremického solútu. Observácia regresných čiar modelu predikujúceho leptinémiu na základe hodnoty Kt/V naznačuje, že práve nerovnomernosť zastúpenia pohlaví medzi cieľovou a kontrolnou podskupinou je faktorom maskujúcim asociáciu leptinémie s chronickou dialyzačnou liečbou. Predpoklad tejto asociácie sa v našom súbore sa na základe analýzy dát zdá byť validný u ženského pohlavia, nie však u mužov. Asociácia leptinémie a Kt/V je pritom inverzná.

Použitá literatúra

- Meyer C, Robson D, Rackovsky N, Nadkarni V, Gerich J. Role of the kidney in human leptin metabolism. *Am J Physiol.* 1997;273(5):E903-E907.
- Merabet E, Dagogo-Jack S, Coyne DW, et al. Increased plasma leptin concentration in end-stage renal disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(3):847-850.
- Wolf G, Hamann A, Han DC, et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]. *Kidney Int.* 1999;56(3):860-872.
- Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. *Am J Physiol.* 1994;266(6 Pt 2): F829-F842.
- Rodríguez-Carmona A, Pérez Fontán M, Cordido F, García Falcón T, García-Buela J. Hyperleptinemia is not correlated with markers of protein malnutrition in chronic renal failure. A cross-sectional study in predialysis, peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Nephron.* 2000;86(3):274-280.
- Scholze A, Rattensperger D, Zidek W, Tepel M. Low serum leptin predicts mortality in patients with chronic kidney disease stage 5. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(6):1617-1622.
- Kalantar-Zadeh K. So, is leptin good or bad in chronic kidney disease?. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(6):1343-1344.
- Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med.* 1996;2(9):949-950.

Malígny melanotický tumor z obalov periférnych nervov - prvý publikovaný prípad na Slovensku

Kolenčíková P.¹, Kalman M.¹, Cmorej M.²

¹Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

²Neurochirurgická klinika, Univerzitná nemocnica Martin

Abstrakt

Prezentácia prípadu zriedkavého melanín produkujúceho neuroektodermálneho tumoru z obalov periférnych nervov vyrastajúceho z koreňa miechy u 62 ročnej ženy. Podľa našich vedomostí ide o prvý publikovaný prípad na Slovensku. Vzhľadom k raritnosti neexistujú štandardné postupy pre liečbu pacientov s týmto typom tumoru. Rovnako je dôležitá aj správna diagnostika vzhľadom k tomu, že tumor môže byť ľahko zamenený za melanóm, ktorý si vyžaduje iný terapeutický prístup. Väčšinou bol opisovaný ako nádor s indolentným správaním, avšak nedávne publikácie poukazujú na jeho agresivitu s častými recidívami a metastatickým potenciálom čo viedlo k jeho preklasifikovaniu na malígny.

Kľúčové slová: (malígny melanotický tumor z obalove periférnych nervov, Carneyho komplex, PRKAR1 gén)

Úvod

Malígny melanotický tumor z obalov periférnych nervov (MMNST) je zriedkavý tumor vznikajúci z melanín produkujúcich Schwanových buniek periférnych nervov autonómneho nervového systému alebo nervov miechy. Jeho výskyt je sporadický alebo môže byť súčasťou Carneyovho komplexu, familiárneho syndrómu charakterizovaného výskytom viacpočetných neoplázií (pigmentové lézie, myxomy, endokrinné tumory, poruchy endokrinných orgánov). V minulosti bol považovaný za nádor s nejasným biologickým správaním avšak podľa súčasnej WHO je klasifikovaný ako malígny nádor s prevažne agresívnym správaním. Vo väčšine prípadov je v nádore zachytená mutácia PRKAR1A génu resp. strata expresie rovnomenného proteínu čo môže byť nápomocné pri diagnostike.

Klinická prezentácia prípadu

62-ročná žena, sťažujúca sa mesiac trvajúcu bolesť vystrelujúcu do pravej inguiny a pravej dolnej končatiny, s pocitom intermitentnej svalovej slabosti dolnej končatiny s negáciou hypestézie či

problémov s močením. V anamnéze uvádza hypotyreózu a DM 2 typu na perorálnej liečbe. Po realizácii MR vyšetrenia bol nájdený tumor canalis sacralis v oblasti S2-S3 s propagáciou do foramen sacrale S2 vpravo. Ošetrojúcim lekárom bola navrhnutá embolizácia tumoru a o päť dní nato operačné riešenie na neurochirurgickej klinike. Počas operácie bola tupo odpreparovaná tumorózna masa vyrastajúca z odstupe koreňa S2 bez poškodenia iných nervových štruktúr. Tumor bol odstránený celý a odoslaný na histopatologické vyšetrenie. Po operácii pacientka vyššie opísané symptómy neguje.

Histopatologické vyšetrenie

Makroskopicky išlo o pomerne ohraničený tumor, oválneho tvaru, priemeru 3cm, na reze regresívne zmenený, hnedočiernej farby s cystickou degeneráciou. Histomorfologicky bol nádor neopúzdrený tvorený z vretenovitých ako aj polygonálnych buniek s vezikulárnymi jadrami s nápadnými jadierkami bez mitotických figúr. V časti buniek boli v cytoplazme obsiahnute granulá melaninového pigmentu. V tumore boli zachytené početné psamomatózne telieska a regresívne zmeny v zmysle krvácania a nekrobiózy. Imunohistochemicky nádorové bunky vykazovali expresiu S100 proteínu, SOX10 a MelanA a negatívu expresie PRKAR1, proliferčný index Ki67 bol do 10% . Dodatočne bolo realizované molekulárne genetické vyšetrenie na stav mutácie BRAF génu metódou rtPCR za účelom vylúčenia malígneho melanómu čo potvrdil negatívny nález (bez mutácie BRAF V600E). Záver histopatologického vyšetrenia bol malígný melanotický tumor z buniek obalov periférnych nervov. Následne bolo u pacientky realizované PET CT vyšetrenie bez nálezu ďalších nádorových ložísk, v súčasnosti je pacientka v dlhodobom sledovaní.

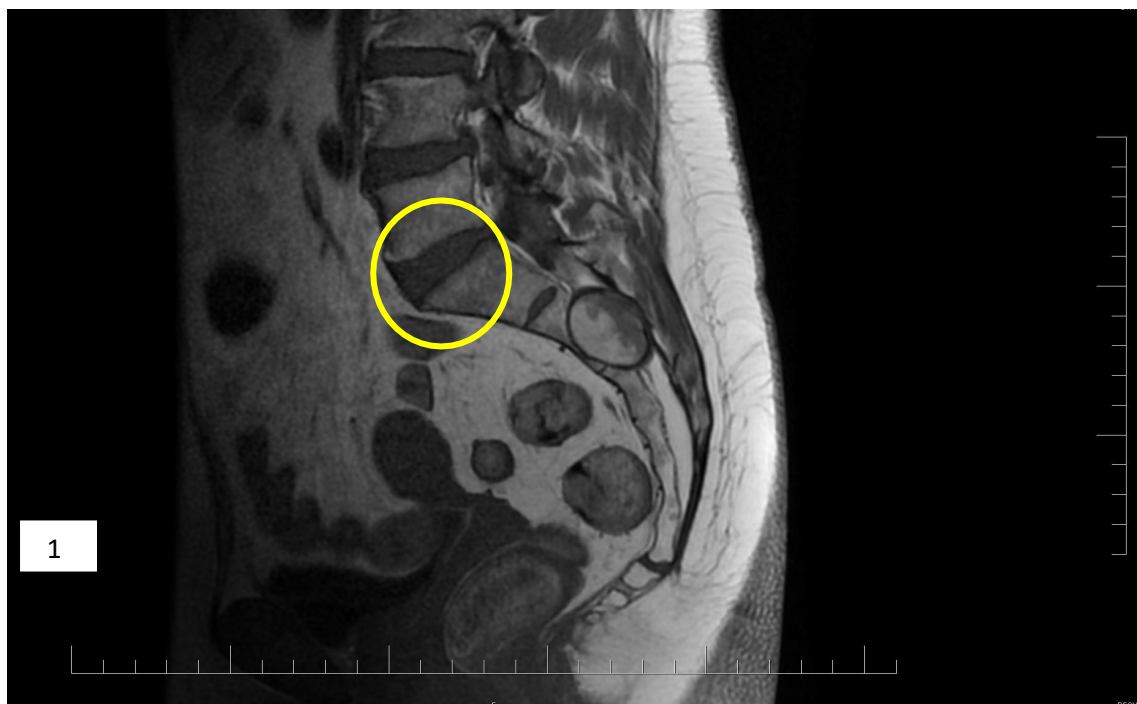
Diskusia

MMNST je raritný tumor vznikajúci z nervov miechy alebo autonómneho nervového systému najčastejšie v blízkosti stredovej osy, zriedkavejšie môže postihovať gastrointestinálny trakt, kosti, mäkké tkanivá, srdce, bronchy, pečeň a kožu (Chetty et al., 2005). Jeho typickou prezentáciou je bolesť, senzorické poruchy a symptomatológia vyplývajúca z expanzívneho rastu tumoru. Ide o nádor dospelého veku častejšie postihujúci ženy, pričom pacienti s Carneyovým komplexom bývajú mladí dospelí s mediánom okolo 22 roku života (Tores-Mora et al., 2014). Väčšinou sú solitárne, v prípade viacpočetných tumorov ide zvyčajne o asociáciu s Carneyovým komplexom. Makroskopicky sú dobre ohraničené, môžu byť parciálne opúzdrené a typicky výrazne pigmentované často s cystickými zmenami. Nádorové bunky sú variabilného tvaru od vretenovitých až po polygonálne, usporiadané do krátkych pruhov alebo solídnych zhhlukov s prítomnosťou melaninového pigmentu. Jadrá bývajú oválneho tvaru s malými jadierkami s eozinofilnou cytoplazmou, zriedkavejšie môžu naopak vykazovať hyperchromáziu s nápadnými jadierkami. V približne 50% prípadov sú prítomné psamomatózne telieska, mitózy a nekrózy sú menej časté (Folpe et al., 2020) . Imunohistochemicky nádor silno exprimuje S100 proteín a SOX10 a melanínové markery ako HMB45, MelanA a tyrozinázu.

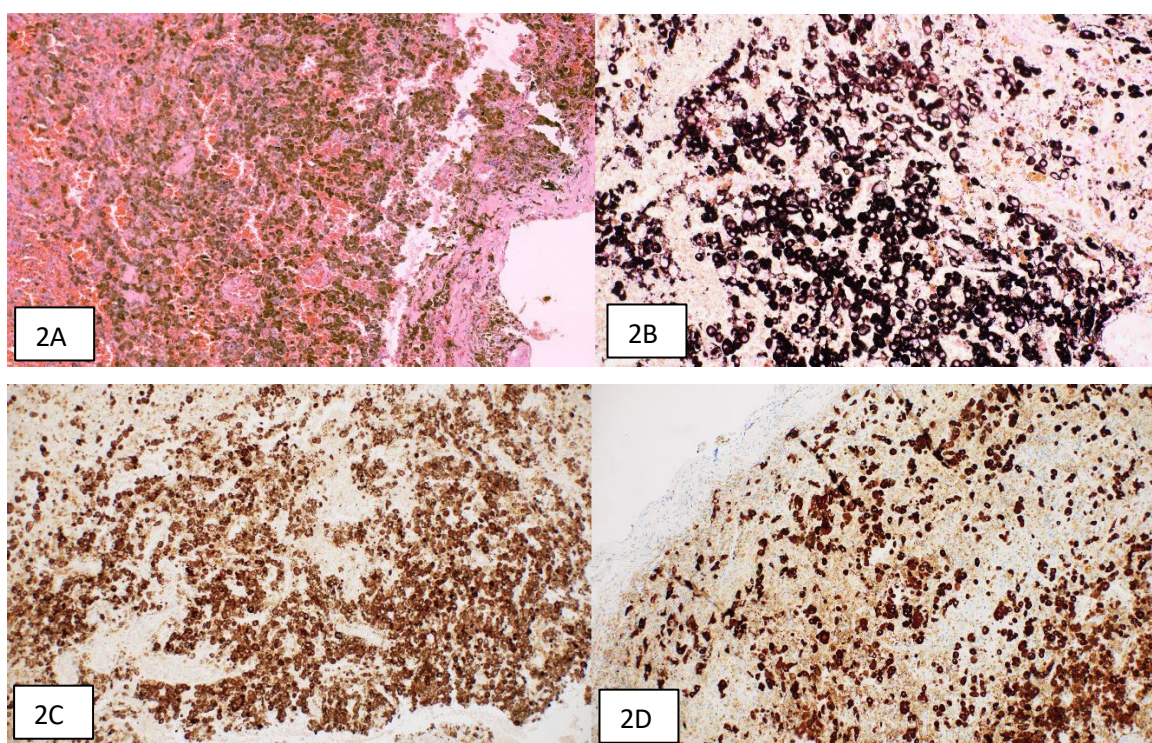
Typickou býva strata expresie PRKAR1 proteínu čo má zásadný význam pri stanovovaní diagnózy (Wang et al., 2015). Súčasná WHO klasifikuje všetky MMNST ako malígne nádory, avšak ich biologické správanie je ťažké predpovedať. V minulosti boli tieto nádory označované ako nádory s nejasným biologickým správaním a s nízkym metastatickým potenciálom (Carney, 1990). Avšak nedávne kazuistiky ukazujú na agresívne správanie s častou lokálnou recidívou a metastázovaním v 26-44% prípadov (Wang et al., 2015, Tores-Mora et al., 2014). Okrem toho len 53% pacientov s viac ako 5 ročným sledovaním bolo reportovaných bez recidívy ochorenia (Khoo, 2016), čo poukazuje na potrebu dlhodobého sledovania týchto pacientov aby bolo možné úplne vylúčiť metastatické riziko. Dodnes neexistujú štandardné postupy pre liečbu týchto zriedkavých tumorov.

Použitá literatúra

- Chetty R, Vajpeyi R, Penwick JL. Psammomatous melanotic schwannoma presenting as colonic polyps. *Virchows Arch.* 2007 Sep;451(3):717-20. doi: 10.1007/s00428-007-0453-0. Epub 2007 Jul 11.
- Torres-Mora J, Dry S, Li X, Binder S, Amin M, Folpe AL. Malignant melanotic schwannian tumor: a clinicopathologic, immunohistochemical, and gene expression profiling study of 40 cases, with a proposal for the reclassification of "melanotic schwannoma". *Am J Surg Pathol.* 2014 Jan;38(1):94-105.
- Folpe AL, Hameed M, Malignant melanotic nerve sheath tumour. WHO Classification of Tumours Editorial Board . Who classification of tumours of soft tissue and bone. 5th ed. Lyon, France: IARC Press, 2020.
- Wang L, Zehir A, Sadowska J, Zhou N, Rosenblum M, Busam K, Agaram N, Travis W, Arcila M, Dogan S, Berger MF, Cheng DT, Ladanyi M, Nafa K, Hameed M. Consistent copy number changes and recurrent PRKAR1A mutations distinguish Melanotic Schwannomas from Melanomas: SNP-array and next generation sequencing analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015 Aug;54(8):463-471.
- Carney JA. Psammomatous melanotic schwannoma. A distinctive, heritable tumor with special associations, including cardiac myxoma and the Cushing syndrome. *Am J Surg Pathol.* 1990 Mar;14(3):206-22.
- Khoo M, Pressney I, Hargunani R, Tirabosco R. Melanotic schwannoma: an 11-year case series. *Skeletal Radiol.* 2016 Jan;45(1):29-34.



Obr. 1 MR snímka, sagitálny rez s tumorom v sakrálnej oblasti S2.



Obr.2 Histomorfologický obraz, farbenie HE obr.2A, zväčšenie 10x, prekrvácaný tumor s početnými polygonálnymi bunkami s obsahom nápadného hnedého pigmentu v cytoplazme. Histochemické

farbenie obr. 2B, melanín, zväčšenie 10x, pozitívne bunky znázornené čiernou farbou. Imunohistochemické farbenie obr. 2C, zväčšenie 10x, dôkaz expresie Sx10. Imunohistochemické farbenie obr.2D, zväčšenie 10x, dôkaz Melan A v nádorových bunkách.

Adresa prvého autora:

MUDr. Petra Kolenčíková, PhD.

Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM

Kollárova 2

036 59 Martin

Morfometrické hodnotenie lymfatických ciev v zdravej koži

Kunertová I¹, Procházková J², Výbohová D¹.

1. Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

2. Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Cieľom štúdie je sledovať rozdiely v hustote lymfatických kapilár kože a expresii VEGF – C a VEGFR₃ v rôznych topografických oblastiach ľudského tela. V štúdiu bolo spracovaných celkovo 110 vzoriek zdravej kože odobratých zo 16 topografických oblastí ľudského tela. Na identifikáciu lymfatických kapilár bola použitá imunohistochemická analýza s Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40, expresiu VEGF-C sme detekovali pomocou Mouse Monoclonal Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4] a VEGFR₃ pomocou Mouse Monoclonal Anti-VEGF Receptor 3 antibody [44CT92.4.4]. Kvantitatívna analýza bola realizovaná morfometrickým softvérom QuickPhoto Micro. Výsledky potvrdili signifikantnú regionálnu variabilitu v hustote lymfatických kapilár v zdravej koži. Najvyššia hustota lymfatických kapilár plexus subpapillaris bola zachytená v regio abdominis, najnižšia na dorsum manus. Regionálna variabilita sa potvrdila aj v expresii VEGF-C a VEGFR₃. Expresia VEGF – C a VEGFR₃ bola vyššia v epidermis ako v dermis zdravej kože.

Kľúčové slová: lymfatické kapiláry, epidermis, dermis, podoplanín, VEGF-C, VEGF-R₃

Úvod

Lymfatická mikrocirkulácia kože je vytvorená obdobne ako krvná mikrocirkulácia v dvoch spletiach: plexus lymphaticus subpapillaris et plexus lymphaticus reticularis. Vasa lymphocapillaria začínajú svojimi slepými koncami v dolných častiach dermálnych papíl a pokračujú do povrchovej splete – plexus lymphaticus subpapillaris. Z tejto spleti pokračujú lymfatické kolektory – vasa lymphatica do hlbkej spleti – plexus lymphaticus reticularis (Ryan et al., 1986; Skobe et Detmar, 2000; Standring et al., 2008).

Tvorba nových lymfatických ciev alebo ich prestavba sa nazýva lymfangiogenéza. Pre reguláciu lymfangiogenézy sú dôležité predovšetkým vaskulárne endotelové rastové faktory: VEGF–C a VEGF–D, viažúce sa na tyrozínkinázový receptor VEGFR-3, exprimovaný na lymfatických endotelových bunkách. Pre vývoj lymfatických ciev počas embryonálneho vývoja je dôležitý hlavne VEGF–C, na postnatálnej lymfangiogenéze sa podieľajú oba faktory, aj keď aj tu prevažuje VEGF-C (Jussila et Alitalo, 2002; Christiansen, et al., 2011).

Vzhľadom na to, že v dostupnej literatúre chýbajú informácie o tom, či existuje regionálna variabilita v

hustote lymfatických kapilár, podobne ako pri krvnej mikrocirkulácii, cieľom tejto štúdie je sledovať kvantitatívne rozdiely v plexus lymphaticus v rôznych topografických oblastiach ľudského tela a porovnať expresiu VEGF – C a VEGFR₃ v epidermis a dermis.

Materiál a metódy

V našej štúdii bolo spracovaných celkovo 110 vzoriek zdravej kože odobratých zo 16 topografických oblastí ľudského tela. Vzorky boli odobraté z kadaverov určených na anatomickú pitvu (11 mužov vo veku medzi 51 – 77 rokov a 4 ženy vo veku medzi 42 až 82 rokov) bez kožného ochorenia v anamnéze.

Imunohistochemická analýza

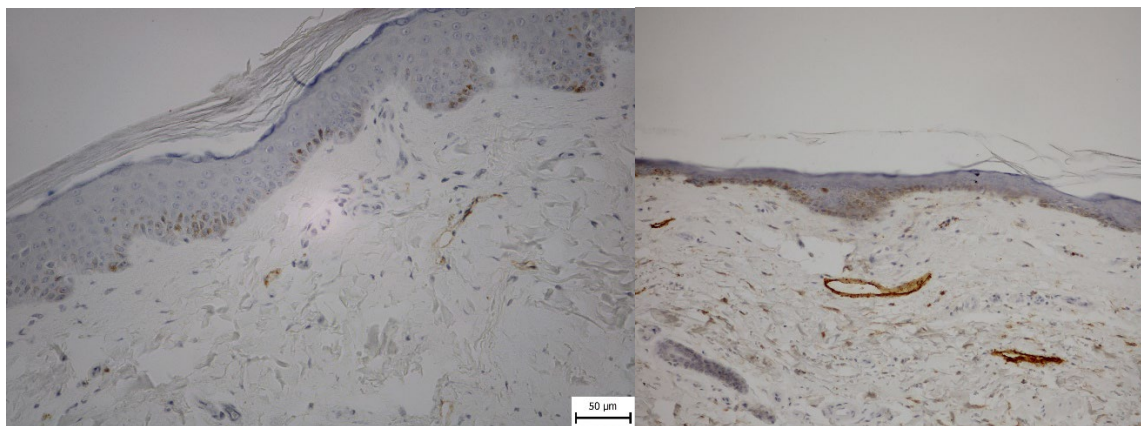
Na identifikáciu lymfatických kapilár (obrázok 1) bola použitá protilátka Monoclonal Mouse Anti-Human D2-40 (Clone D2-40, Dako, Denmark A/S), ktorá sa viaže na podoplanín – transmembránový sialoglykoproteín považovaný za spoľahlivý marker lymfatických endoteliálnych buniek v koži. Expresia VEGF-C (obrázok 2) bola analyzovaná pomocou protilátky Mouse Monoclonal Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4] (Abcam, ab191274, United Kingdom), VEGFR₃ (obrázok 3) pomocou protilátky Mouse Monoclonal Anti-VEGF Receptor 3 antibody [44CT92.4.4] (Abcam, ab72240, United Kingdom) (Abcam, 2018).

Imunohistochemická analýza bola vykonaná pomocou automatizovaného farbiaceho systému Autostainer Link 48 (Dako). Ako detekčný systém bol použitý Dako EnVision Flex, High pH, pričom chromogénmi boli diaminobenzidín (DAB) a magenta. Kontrastné dofarbenie bolo realizované hematoxylínom (EnVision FLEX Hematoxylin, Dako).

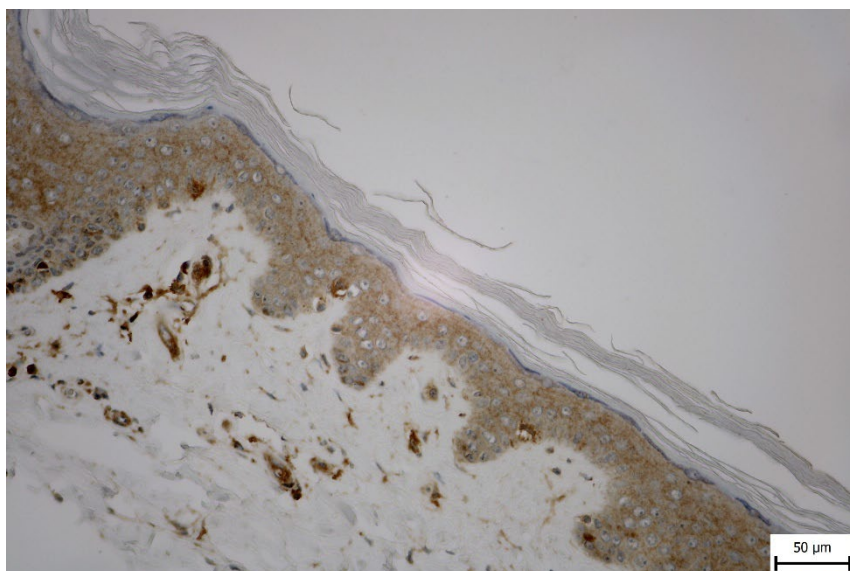
Morfometrické vyhodnocovanie

Kvantitatívna analýza bola uskutočnená pomocou morfometrického softvéru QuickPhoto Micro (Promicra, Česká republika). Digitálne obrazy boli analyzované na základe nasledovných parametrov:

- percentuálna plocha lymfatických endotelových buniek – podiel podoplanín-pozitívnej plochy vzhľadom na celkovú plochu obrazu alebo štandardizovanú plochu dermis
- percentuálna VEGF-C pozitívna plocha – podiel VEGF-C pozitívnej oblasti vzhľadom na celkovú plochu obrazu alebo štandardizovanú plochu dermis
- percentuálna VEGFR₃ pozitívna plocha – podiel VEGFR₃ pozitívnej oblasti vzhľadom na celkovú plochu obrazu alebo štandardizovanú plochu dermis.

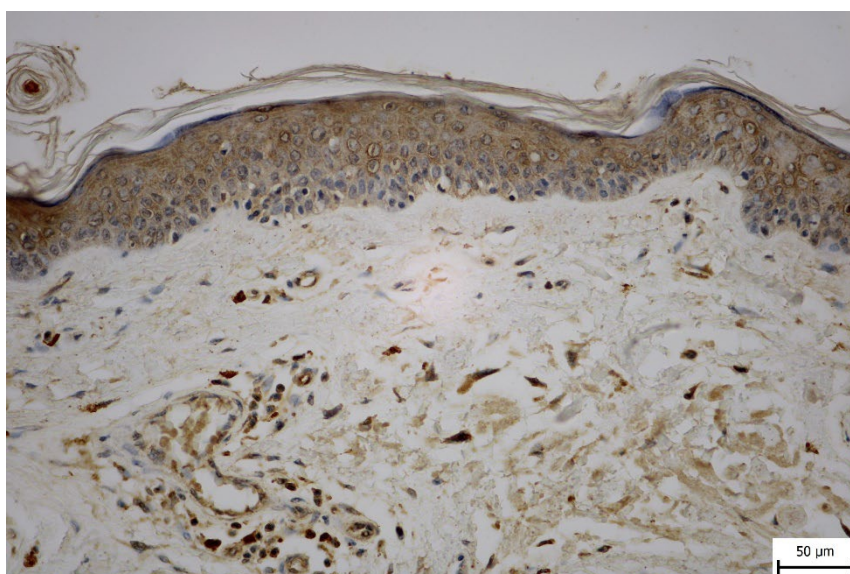


Obrázok 1 Detekcia lymfatických kapilár v zdravej koži. Imunohistochemické farbenie s Monoclonal Mouse Anti-Human D2-4o (Clone D2-4o, Dako, Denmark A/S).



Obrázok 2

Expresia VEGF-C v zdravej koži. Imunohistochemické farbenie s Mouse Monoclonal Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4] (Abcam, ab191274, United Kingdom).



Obrázok3

Expresia VEGFR3 v zdravej koži. Imunohistochemické farbenie s Mouse Monoclonal Anti-VEGF Receptor 3 antibody [44CT92.4.4] (Abcam, ab72240, United Kingdom)

Výsledky

Morfometrické vyhodnocovanie plochy endotelových buniek lymfatických kapilár na základe imuohistochemickej detekcie v štandardnej ploche pars papillaris dermis potvrdilo signifikantnú regionálnu variabilitu v percentuálnom zastúpení plochy lymfatických endotelií (viď tabuľka 1). Najvyššia hustota lymfatických kapilár bola v regio abdominis, najnižšia na dorsum manus.

Tabuľka č 1. Percento podoplanín pozitívnej plochy v jednotlivých topografických oblastiach v pars papillaris dermis v zdravej koži.

regio (n =110)	% podoplanín pozitívnej plochy - plocha lymfatických endotelií
regiones faciei	0,552 ± 0,346
regiones thoracis	0,578 ± 0,285
regiones abdominis	0,842 ± 0,179
regiones dorsi	0,485 ± 0,172
regio brachialis anterior	0,704 ± 0,195
regio brachialis posterior	0,610 ± 0,185
regio antebrachialis anterior	0,668 ± 0,258
regio antebrachialis posterior	0,716 ± 0,249
palma manus	0,388 ± 0,104
dorsum manus	0,140 ± 0,077
regio glutea	0,641 ± 0,145
regio femoris anterior	0,498 ± 0,085
regio femoris posterior	0,408 ± 0,264
regio cruris anterior	0,495 ± 0,085
regio cruris posterior	0,825 ± 0,092
dorsum pedis	0,486 ± 0,238
Kruskal -Wallis test	p < 0,0001

V tabuľke 2 sú uvedené percentá VEGF-C pozitívnej plochy v jednotlivých topografických oblastiach v epidermis a dermis. Štatistická analýza potvrdila regionálnu variabilitu v expresii VEGF- C v dermis, a tiež signifikantne vyššiu expresiu VEGF-C v epidermis ako dermis. Tabuľka 3 uvádza percento VEGFR3 pozitívnej plochy v zdravej dermis et epidermis. Štatistická analýza potvrdila regionálnu variabilitu v expresii VEGFR3 v epidermis aj dermis dermis, a tiež signifikantne vyššiu expresiu VEGFR3 v epidermis ako dermis.

Tabulka č 2 . Expresia VEGF-C v epidermis a dermis v zdravej koži.

regio (n =110)	% VEGF- C pozitívnej plochy v epidermis	% VEGF- C pozitívnej plochy v dermis
regiones faciei	5,618 ± 1,843	3,138 ± 0,989
regiones thoracis	5,279 ± 2,874	3,563 ± 2,375
regiones abdominis	4,566 ± 1,519	2,925 ± 1,409
regiones dorsi	5,395 ± 3,059	4,111 ± 1,540
regio brachialis anterior	3,829 ± 2,148	2,610 ± 0,698
regio brachialis posterior	3,799 ± 2,180	2,269 ± 0,546
regio antebrachialis anterior	4,553 ± 1,817	2,196 ± 1,565
regio antebrachialis posterior	4,553 ± 1,691	2,657 ± 0,537
palma manus	4,125 ± 0,387	2,522 ± 1,209
dorsum manus	4,095 ± 1,506	3,444 ± 1,161
regio glutea	4,387 ± 0,913	2,637 ± 1,500
regio femoris anterior	4,535 ± 2,719	2,786 ± 1,348
regio femoris posterior	3,486 ± 0,663	2,894 ± 0,597
regio cruris anterior	3,892 ± 2,238	2,374 ± 1,206
regio cruris posterior	4,446 ± 1,243	2,639 ± 1,454
dorsum pedis	6,115 ± 1,519	4,801 ± 1,138
Kruskal -Wallis test	p= 0,286	p= 0,025

Tabulka č 3 . Expresia VEGFR₃ v epidermis a dermis v zdravej koži.

regio (n =110)	% VEGFR ₃ pozitívnej plochy v epidermis	% VEGFR ₃ pozitívnej plochy v dermis
regiones faciei	6,749 ± 0,710	4,401 ± 0,954
regiones thoracis	3,563 ± 2,375	2,925 ± 1,409
regiones abdominis	5,561 ± 2,378	2,871 ± 0,688
regiones dorsi	4,742 ± 2,077	2,796 ± 0,967
regio brachialis anterior	4,388 ± 1,741	2,215 ± 0,911
regio brachialis posterior	4,038 ± 1,311	2,157 ± 0,212
regio antebrachialis anterior	3,474 ± 0,590	2,909 ± 1,229
regio antebrachialis posterior	4,128 ± 0,827	2,658 ± 0,424
palma manus	5,111 ± 1,578	4,201 ± 1,984

dorsum manus	4,320 ± 1,298	2,644 ± 0,702
regio glutea	4,155 ± 0,649	2,312 ± 0,933
regio femoris anterior	3,971 ± 1,546	2,737 ± 0,667
regio femoris posterior	3,364 ± 0,700	2,631 ± 0,255
regio cruris anterior	3,499 ± 0,960	2,332 ± 1,083
regio cruris posterior	4,083 ± 0,552	2,329 ± 0,487
dorsum pedis	5,513 ± 2,563	2,908 ± 0,956
Kruskal -Wallis test	p= 0,002	p= 0,004

Diskusia

Výsledky našej štúdie potvrdili signifikantnú regionálnu variabilitu v hustote lymfatických kapilár plexus subpapillaris kože podobne ako je to s regionálnou variabilitou krvných kapilár kože. Najvyššia hustota lymfatických kapilár bola zaznamenaná v regio abdominis, najnižšia na dorsum manus. Najvyššia hustota krvných kapilár sa zvyčajne uvádza na palma manus et planta pedis, najnižia na dorsum pedis et regio cruris anterior (Pasyk et al., 1989). Regionálna variabilita sa potvrdila aj v expresii VEGF-C a VEGFR3. Expresia VEGF – C a VEGFR3 bola vyššia v epidermis ako v dermis zdravej kože.

Lymfatický systém zohráva kľúčovú úlohu pri udržiavaní rovnováhy tkanivových tekutín a podieľa sa na imunitných procesoch organizmu. Lymfatické cievy umožňujú prechod tekutín a vysokomolekulových látok, ktoré za normálnych okolností nemôžu prestupovať stenou krvných kapilár do krvného obehu, a preto sú transportované ako súčasť lymfy. Objem tekutiny unikajúcej z krvných kapilár prevyšuje jej spätný prítok, pričom prebytočná tekutina vstupuje do lymfatických ciev a následne je odvádzaná do venózneho systému. Okrem tekutín lymfatické cievy odstraňujú z interstícia približne 25 – 50 % cirkulujúcich plazmatických bielkovín a zabezpečujú ich návrat do žilového systému (Ganong, 2002; Javorka et al., 2014).

V koži sa nachádzajú lymfatické kapiláry, prekolektory a kolektory. Lymfatické kapiláry slepo začínajú v papilách dermis resp. na rozhraní pars papillaris et reticularis dermis (Standring et al., 2008; Čihák, 2016). Lymfatické kapiláry prebiehajú v tesnej blízkosti krvných kapilár ich lúmen je však väčší (okolo 50-60 µm) a značne nepravidelný, a stena oveľa tenšia (50-100nm vs 2,5-3,5 µm). Napriek tomu, že krvné a lymfatické kapiláry sa nachádzajú v bezprostrednej blízkosti nikdy nevytvárajú anastomózy (Skobe et Detmar, 2000). Pre lymfatické kapiláry je charakteristická tenšia endotelová výstelka ako v krvných kapilárach, bazálna membrána chýba alebo je inkompletná a jej stena nie je stabilizovaná pericytmi. K abluminálnemu povrchu endotelových buniek lymfatických kapilár sa však upínajú mikrofilamenty fibrilínu tzv. kotviace fibrily, ktoré fixujú kapiláru k elastickým a kolagénovým vláknam v dermis a reagujú na zmeny v interstíciu. V prípade zvýšeného tlaku v interstíciu, napríklad pri edéme, sa ťahom kotviacich fibríl kapiláry otvárajú (zväčšujú svoj lúmen) a zväčšujú sa aj štrbiny medzi endotelovými bunkami, čím sa výrazne zvýši permeabilita cievnej steny

(Gerli et al., 2000; Skobe et Detmar, 2000; Baluk et al., 2007; Lullmann-Rauch, 2012; Lund et al., 2016).

Endotelové bunky lymfatických kapilár sa tvarom podobajú dubovému listu a nie sú medzi sebou tak pevne spojené ako v krvných kapilárach. Vytvárajú ventilové spojenia (Lullmann-Rauch, 2012) tzv. „button like junctions“ (Baluk et al., 2007) alebo „overlapping intercellular junctions“ (Skobe et Detmar, 2000), ktoré sú jedinečné a typické iba pre lymfatické kapiláry. Výbežky susedných endotelových buniek lymfatických kapilár sa vzájomne prekrývajú a fungujú ako ventily. (Skobe et Detmar, 2000; Baluk et al., 2007; Lullmann-Rauch, 2012).

Collectores lymphatici majú podobné usporiadanie cievnej steny ako malé žily (Lullmann-Rauch, 2012). Majú vytvorenú súvislú bazálnu membránu, na ktorú nasadajú podlhovasté oválne endotelové bunky, ktoré majú nielen iný tvar ako endotelové bunky kapilár, ale aj expresiu génov, nakoľko v oveľa menšej miere exprimujú LYVE-1 a VEGFR-3 (Baluk et al., 2007). Tenká svalová vrstva v stene lymfatických kolektorov umožňuje rytmické kontrakcie a systém chlopní zasa zabraňuje retrográdnemu toku lymfy (Lullmann-Rauch, 2012; Lund et al., 2016). Je zaujímavé, že tela subcutanea nemá vlastné lymfatické cievy (Skobe et Detmar, 2000). V zdravej ľudskej koži nepodlieha lymfatická cirkulácia výrazným zmenám.

Použitá literatúra

Abcam. Product datasheet: Anti-VEGFC antibody [197CT7.3.4] [Internet]. Dostupné na: <https://www.abcam.com/vegfc-antibody-197ct734-ab191274.html> [cit. 2018 Jan 11].

Abcam. Product datasheet: Anti-VEGF Receptor 3 antibody [44CT92.4.4] [Internet]. Dostupné na: <https://www.abcam.com/vegf-receptor-3-antibody-44ct9244-ab72240.html> [cit. 2018 Jan 1].

Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, McDonald DM. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med*. 2007;204(10):2349–62.

Čihák R. Anatomie. Praha: Grada Publishing; 2016. p. 627–51.

Christiansen A, Detmar M. Lymphangiogenesis and cancer. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1146–58.

Ganong WF. Přehled lékařské fyziologie. Praha: Galen; 2002.

Gerli R, Solito R, Weber E, Agliano M. Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics. *Lymphology*. 2000;33(4):148–57.

Javorka K, et al. Lekárska fyziológia. Martin: Vydavateľstvo Osveta; 2014. p. 225–35.

Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*. 2002;82(3):673–700. doi:10.1152/physrev.00005.2002.

Lund AW, Medler TR, Leachman SA, Coussens LM. Lymphatic vessels, inflammation, and immunity in skin cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(1):22–35. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0023.

Lüllmann-Rauch R. Histologie. Praha: Grada Publishing; 2014.

Pasyk KA, Thomas SV, Hassett CA, et al. Regional differences in capillary density of the normal human dermis. *Plast Reconstr Surg*. 1989;83(6):939–45.

Ryan TJ, Mortimer PS, Jones RL. Lymphatics of the skin. *Int J Dermatol*. 1986;25(7):411–9. doi:10.1111/j.1365-4362.1986.tb03443.x.

Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):14–9.

Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.

Nehojaci sa ulkus predkolenia, zaujímavý problém etiopatogenézy

Kolenčíková P.^{1,2}, Adamicová K.^{1,2}

1. Konzultačné centrum bioptickej diagnostiky kožných ochorení na Ústave patologickej anatómie Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
2. Ústav patologickej anatómie Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Chronický, niekedy recidivujúci vred dolných končatín má rôznu etiopatogenézu a podľa príčiny aj modifikovaný základný histopatologický obraz. Vred predkolenia vo varikóznom teréne má svoje základné usporiadanie a to nepravidelný tvar, nekrotickú debris v centre, proliferatívne a produktívne okraje. Spodina je tvorená granuláciami, hojí sa pomaly a často ostáva povlečená hnisavou membránou. Občas hnilobne zapácha. Tento obraz nerobí závažné diferenciálne diagnostické problémy. Patológ bioptik však má povinnosť nájsť konkrétne zmeny, ktoré mu umožnia spresniť diagnózu vredu a tým pomôcť terapii (vaskulitídy, pyoderma gangrenosum, infekcie, trauma, iné).

V našom príspevku prezentujeme nezvyčajné histopatologické zmeny u pacienta s chronickým opakujúcim sa vredom predkolenia. Bioptické vyšetrenie a kompletizované anamnestické a klinické údaje dali odpoveď na príčinu nehojaceho sa vredu predkolenia. Išlo o výtrusový prach výtrusných rastlín, najmä plavúňa obyčajného.

Kľúčové slová: chronický ulkus predkolenia, výtrusový prach plavúňa obyčajného

Úvod

Vred predkolenia (ulcus cruris) je strata kožnej substancie, ktorá zasahuje rôzne hlboko do podkožia. Ide o chronickú ranu s dobou hojenia trvajúcou viac než 6 týždňov. Vzniká následkom závažných trofických zmien tkaniva predtým poškodeného predchádzajúcim ochorením najčastejšie vaskulárnym. Postihuje pacientov v staršom veku a ide často o polyetiologické ochorenie (Wu, 2025), pričom najčastejšou príčinou (85 %) vzniku vredu v tejto oblasti sú primárne varixy, či flebotrombóza (ulcus cruris venosum), z arteriálnych príčin vzniká cca 10 % vredov a 5 % vredov má iné príčiny (Pospíšilová A, 2022).

Iné príčiny možno rozdeliť do niekoľkých skupín: a) iné cievne príčiny – lymfatické cievy, b) nádorové príčiny - spinocelulárny karcinóm, bazocelulárny karcinóm, malígný melanóm, lymfómy, metastázy, c) prejavy infekcie – huby, baktérie, mykobaktérie, parazity, d) autoimúnne mechanizmy - vaskulitídy,

iné,

e) z krvných príčin – hematogénne a koagulačné, f) z iných príčin - metabolických príčin, z neuropatických ochorení, či so zmiešanou patogenézou (Pospíšilová A, 2008). V oblasti predkolenia možno nájsť aj vredy po traume (zvyčajne, bez komplikácií a hojenie je rýchlejšie), (Kopal T, 2009) a aj chronický vred bez známej etiopatogenézy a s častými problémami pri hojení a to ulceróznym prejavom pyodermy gangrenosum (neinfekčná neutrofilná dermatóza), histopatologicky diagnostikovaná per exclusionem (Colonje et al. 2012). Histopatologický obraz chronického ulkusu kože je pomerne uniformný.

Histopatologický obraz vředu kože

Na povrchu vředu nachádzame vrstvu zloženú z exsudovaného fibrínu a leukocytov. Hlbšie sa nachádza vrstva bohatá na kapiláry, medzi ktorými je hojný počet leukocytov, lymfocytov, histiocytov a plazmatických buniek. Niekedy možno sledovať kapiláry, ktoré vytvárajú kľučky obrátené konvexitou hore. Epiderma na okraji ulkusu je zachovaná, často sa ohýba a previsuje do defektu. V kóriu sú dilatované kapiláry a na hranici defektu je zápalový infiltrát rôznej aktivity. Najhlbšia vrstva je fibroangioblastická, podľa dĺžky trvania lézie až kolagenizovaná. Fibroblasty sú orientované zvyčajne kolmo na angioproliferatívne cievy. Vaskularizácia a bunečnosť sa v chronickom vřede stráca. Podľa etiológie a patogenézy sa tento základný obraz typicky mení (Brozman et al. 1968).

Kazuistický prípad

Pacient narodený v roku 1963, pred rokmi s vykonanou transplantáciou obličky v súčasnosti na dlhodobú systémovú imunosupresívnu terapiu, mal pri prvom biopsickom vyšetrení 60, a pri opakovanom vyšetrení 61 rokov. Prvé vyšetrenie biopsizovalo ložisko na koži pravého lýtko s klinickou dg. supponované erythema nodosum(?), či vaskulitída (?). Histopatologický obraz zodpovedal prevažne lobulárnej nekrotizujúcej a fibrotizujúcej zmiešanej panikulitíde (obr. 1). Epiderma, ani horná časť dermy v odoslanom materiáli neboli zachytené. O viac ako pol roka nasledovala ďalšia biopsia zo susednej lokality, označená ako hlboký defekt kože pravého predkolenia, so supponovaním klinických dg. erythema nodosum či pannikulitída. Histologický obraz zodpovedal hlbokému chronickému ulkusu, v povrchovej vrstve s rozsiahlou nekrózou tkaniva. Pod nekrózou sa nachádza výrazná nešpecifická zápalová angioproliferatívna a fibroproliferatívna reakcia (obr.2). Napriek výraznej nekróze tkaniva bol zápalový infiltrát aktívneho zmiešaného charakteru disperzný a nenápadný. Mimoriadnym nálezom na povrchu nekrotickej debris ulkusu bola kolekcia početných sférických či oválnych štruktúr v priemere cca 0,03 až 0,04mm. Obal teliesok bol hrubý, na vonkajšej strane ojedinele s ostrými výčnelkami. Centrum teliesok bolo prázdne, alebo obsahovalo rôzne početné drobné guľaté štruktúry (obr. 4, 5). PAS pozitivita nebola výrazná, PAS s diastázou sa

znázorňovali iba o málo bledšie. V polarizovanom svetle častice nevykazovali birefrakrétnosť. Predbežný záver biopsie: Nález sme hodnotili ako nešpecifický nekrotizujúci chronický ulkus kože s mohutnou reaktívnou angioproliferatívnou zónou v periférii od steny ulkusu. V nekrotickej debris so (zatiaľ) neznámymi štruktúrami plesňového (?), rastlinného (?), či iného (?) pôvodu (obr. 3, 4). Chirurga sme informovali, že neznáme štruktúry budeme študovať a konzultovať, so snahou v náleze jednoznačne informovať o získanom diagnostickom závere.

Tab. 1 Použité metódy bioptického vyšetrenia

IHCH vyšetrenie	Nález	Lokalizácia
CD3+ T-Ly	+	Zápalový infiltrát v oblasti steny ulkusu
CD20+ B-Ly	+	Zápalový infiltrát v oblasti steny ulkusu
CD30+ elementy	-	
CD68+ histiocyty	+	Zápalový infiltrát v oblasti steny ulkusu
Kappa+/Lambda+ polyklonové PI	+/+	Zápalový infiltrát v oblasti periférie steny ulkusu
MPO+leukocyty	+	Povrchová lokalizácia ulkusu
CD34+	+	Endotel ciev, najmä v úsekoch výraznej proliferácie
SMA+	+	V zrelších stenách ciev proliferovaných v okolí ulkusu
Špeciálne metódy		
PAS	+	Sferoidné telieska na povrchu ulkusu
PAS+ diastáza	+/-	Sferoidné telieska na povrchu ulkusu
Gram	-/-	

V ďalšom diagnostickom postupe sme postupovali empiricky. Zvažovali sme prítomnosť plesní, rastlinných častíc, či iných neznámych teliesok.

Materiál sme v ďalšom postupe konzultovali s Ústavom mikrobiológie a imunológie JLF UK v Martine, na potvrdenie alebo vylúčenie nami suponovanej adiasporomykózy pre zdanlivú podobu sferul *Emmonia crescens* s nami opísanými štruktúrami. Tieto štruktúry majú schopnosť po prenesení do prostredia s teplotou 37° C. konvertovať z fázy mycelárnej do parazitickej za tvorby charakteristických mnohoadrových hrubostenných sferul (adiaspor). Táto mykóza však nebola potvrdená, naviac ide skôr o agens vyvolávajúci respiračnú, nie kožnú infekciu (Kodousek, 2003). V ďalšom postupe sme diferenciálnu diagnostiku zamerali na možnosť, že pacient si sám liečil vred fytoterapiou, najskôr tinktúrou z kvetov ľalie bielej. Po histopatologickom experimente sme túto možnosť vylúčili, pre úplne odlišný vzhľad buniek a štruktúr získaných z kvetu ľalie bielej. V ďalšom sme zaslali bioptické mikrofoto s opísanými štruktúrami na pracovisko Prírodovedeckej fakulty UK, Biologickej sekcie na

Katedru botaniky. Štúdiom mikrofotky bolo zistenie, že nejde o peľ, ale o zmes spór, t. j. výtrusov výtrusných rastlín, prevažne papraďorastov, t.j. sladičorastov, ako aj spor *Polypodia*, *Pteridia* a fragmentov z plavúňa – *Lycopodium* (obr. 3, 4). Evidentne išlo o zmes výtrusov výtrusných rastlín z lesného prostredia (Mičieta, 2024). Pri prvej pooperačnej kontrole pacienta bola rana primerane zhojená, stehy boli extirpované. Na opakujúcu sa a doplňujúcu anamnestickú otázku klinika, pacient odpovedal, že po návšteve liečiteľa, od ktorého získal jemný žltý prášok pod názvom plavúň obyčajný (*Lycopodium clavatum*), si týmto zasypával povrch ulkusu. Podobne ako sme uviedli v predbežnom náleze, sme mohli definitívnu diagnózu ukončiť konštatovaním, že ide o chronický recidivujúci ulkus predkolenia nešpecifického charakteru, bez jednoznačnej možnosti vyjadriť sa k etiopatogénne ulkusu s nálezom výtrusov výtrusových rastlín z lesného prostredia (obr.5).

Diskusia

Vredy predkolenia patria medzi najčastejšie patologické stavy zasahujúce dolné končatiny. Dajú sa ľahko diagnostikovať voľným okom. Chronický vred predkolenia, označovaný aj ako chronický vred dolných končatín, je chronická rana, ktorá nemá tendenciu na hojenie po troch mesiacoch adekvátnej liečby alebo nie je úplne zahojená ani po 12 mesiacoch. Približne 1 % celosvetovej populácie bude mať vred predkolenia niekedy v priebehu svojho života. Vredy predkolenia predstavujú významné bremeno pre pacientov, ich ošetrovateľov a rodiny, lekárov, ako aj celý zdravotný systém. Vredy predkolenia môžu spôsobovať sociálnu izoláciu, ohrozovať rodinný život a ovplyvňovať pracovnú schopnosť pre bolesti, časté liečebné procedúry a návštevy u lekárov. Liečba pacientov s chronickými ranami predstavuje záťaž pre celú spoločnosť.

Správna diagnostika je základom pre adekvátny manažment a vyvarovanie sa nesprávnej liečbe, ktorá môže oddialiť hojenie, spôsobiť zhoršenie rany a poškodenie pacienta. Presná diagnostika je kritická z hľadiska úspešnej liečby. Meranie parciálneho tlaku kyslíka (TcPO₂), určenie členkovo-brachiálneho tlakového indexu (ABPI) a duplexná sonografia sú základnými diagnostickými metódami, ktoré umožňujú správny terapeutický postup (Mareschová et al. 2020). Tieto metódy patria do klinického inštrumentária. Nie každý ulkus je nutné diagnostikovať aj biopticky, pretože nie sú vždy histopatologicky príznačné. Obraz chronického ulkusu je pri vyvinutom štádiu pomerne jednoduchý: na povrchu nachádzame exsudáciu fibrínu a drť leukocytov, pod týmto detritom je vrstva nekrózy (niekedy fibrinoidnej). Nekróza je ohraničená nešpecifickým granulačným tkanivom, rôzneho stupňa zrelosti. Proliferované kapiláry sa vyvíjajú vertikálne k povrchu. V dolnej tretine sú fibroblasty, lymfocyty, histiocyty v rôznom povere a množstve a ďalej formácia kolagénovej časti spodiny a steny ulkusu (Santritter, 1989). Najmä začínajúci a „zrelý“ ulkus, keď vzniká na určitom patogenetickom podklade môže byť presnejšie určený. Napr. ulkus na základe trombangitis obliterans (je typický arteritídou, flebitídou, rýchlou obturujúcou trombózou, niekedy s minimálnou rekanalizáciou), či

ulkus pri pyoderma gangrenosum (ide o „sterilný“ ulkus bez prítomnosti patogénnych mikroorganizmov, s odlišným správaním sa pri chirurgickej terapii), dna (arthritis urica), kde môžeme dokázať prítomnosť zmnoženého metabolitu. Nádorové vredy, kde dokazujeme primárne či sekundárne nádorové ochorenie. Infekčné vredy, v ktorých môžeme kultiváciou alebo špeciálnymi farbiacimi metódami dokázať niektoré s patogénnych mikroorganizmov, a pod.

V niektorých prípadoch, ako uvádzame v našom príspevku, možno diagnostikovať nepoznané štruktúry, ktoré si vyžadujú precízny diferenciálno-diagnostický postup aj s inými medicínskymi či paramedicínskymi pracoviskami. Na povrchu ulkusu sme našli telieska, ktoré mohlo byť morfológicky adiasporomykózou (*Emmonia crescens*), ktorú vylúčili mikrobiológovia. V prípade potvrdenia tejto možnosti by mohlo ísť o vyvolávateľa, alebo spoluvyvolávateľa ochorenia. Na prírodovedeckom, botanickom pracovisku však boli poznané výtrusy výtrusových rastlín z lesného prostredia, pričom pacient potvrdil „terapiu“ chronického ulkusu výtrusmi plavúňa obyčajného, na odporúčanie liečiteľa. Išlo teda o prírodné fytoterapeutikum. Plavúň obyčajný (*Lycopodium clavatum*) sa často používa v homeopatii. V liečiteľstve sa používa hlavne výtrusový prach. Svetložltý prach sa používa na zásyp rán, ako dermatologikum a pilulkový konspergens. Spóry tvorí z polovice tuk, ďalej obsahujú sporoníny (20 %), hydroxylkávovú kyselinu malé množstvo alkaloidov a sacharózu. Na území Slovenska patrí medzi chránené rastliny (Wikimedians Slovakia, 2021). Z dôvodu nariadenia EÚ nie je možné uvádzať liečivé účinky tejto rastliny (12). Aj tak sa možno domnievať, že práve tento prášok bol príčinou toho, že napriek rozsiahlej a hlbkej nekróze sme v chronickom vrede zaznamenali iba riedky zápalový infiltrát.

Tab. 2. Rôzne príčiny vzniku chronického vrodu predkolenia (upravené podľa 9)

Vaskulárne <ul style="list-style-type: none"> • venózne • arteriálne • zmiešané 	Trauma <ul style="list-style-type: none"> • tlak • poškodenie • popálenie
Neuropatické <ul style="list-style-type: none"> • diabetické • tabes dorsalis • syringomyelia 	Tumory <ul style="list-style-type: none"> • skvamocelulárny karcinóm • bazalióm • melanóm • sarkóm
Metabolické <ul style="list-style-type: none"> • diabetes mellitus • dna • prolidasová deficiencia 	Infekcie <ul style="list-style-type: none"> • bacterialne • plesňové • protozoálne

Hematologické <ul style="list-style-type: none"> • sickle cell anémia • kryoglobulinémia 	Iné a/alebo z neznámych príčin Napr. pyoderma gangrenosum a/ alebo zaradené do viac skupín napr. Morbus Winiwarter-Buerger (trombangitis obliterans). Môže byť arteriálna oklúzia, alebo zápal (?).
---	---

Záver

Príspevok uvádzame z dôvodu čoraz častejších netypických a arteficiálnych nálezov v inak klasickom bioptickom náleze kožných ochorení. Opis a fotografický materiál má slúžiť zorientovať sa bioptikom a dermatohistopatológom pri identifikácii takýchto nálezov.

Použitá literatúra

Wu B, Shinohara M. Pyoderma gangrenosum. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/skinntumorpyodermagangrenosum.html>. Accessed January 23rd, 2024.

Pospíšilová A. Bércový vřed. https://www.wikiskripta.eu/w/B%C3%A9rcov%C3%BD_v%C5%99ed. 2022

Pospíšilová A. Bércový vřed. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2008, roč. 2, vol. 2, s. 79-84.

Kopal T. Terapeutické možnosti pri rezistentnom vrede. *Dermatologická prax*, 2009, 3(4); s. 163-166

Colonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH: McKee's pathology of the skin. 4th ed. Vol. 1, Elsevier 2012, Chapter 15 Neutrophilic and eosinophilic dermatoses. 631-628s.

Brozman M, Ondruš B. Úvod do histopatológie. Obzor 1968. 435 s.

Kodousek R. Mykózy. UP v Olomouci 2003, 2005.

Mičieta K. personálna informácia, e-mail 18. 01. 2024

Mareschova K, Štvrtinová V. Differential diagnosis of the leg ulcer. *Vask. med.*, 2020;12(1):17-23

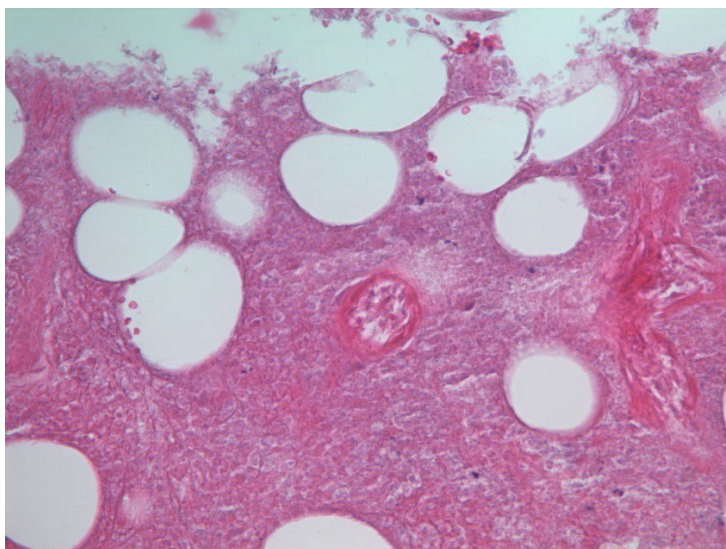
Thomas C. Santritter. Histopathology. B. C. Decker Inc. Toronto-Philadelphia 1989; 386 s.

Wikimedians Slovakia. Plavúň obyčajný. (2021)

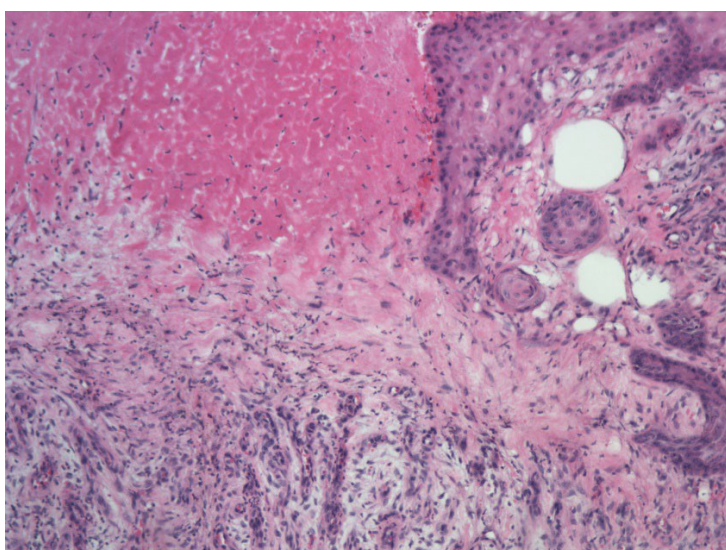
https://sk.wikipedia.org/wiki/Plav%C3%BA%C5%88_oby%C4%8Dajn%C3%BD

Plavúň obyčajný. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/prir-farmacia-plavun-obycajny-vnat-716168.html>

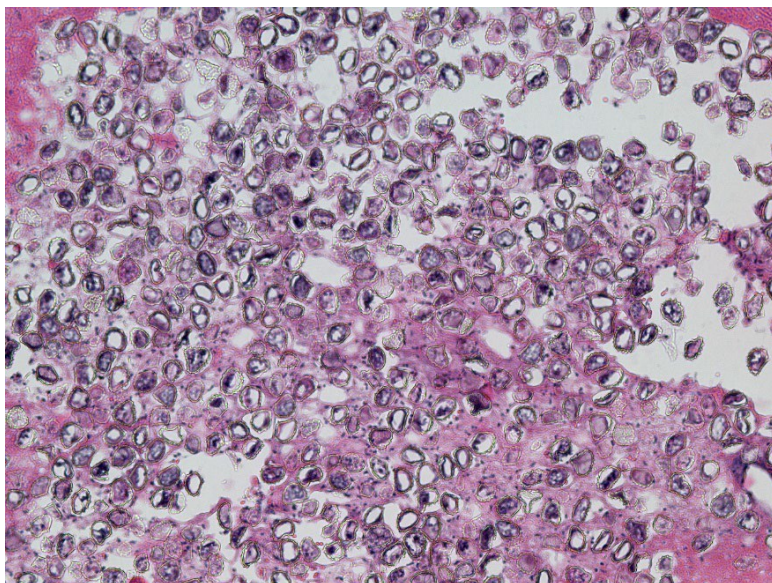
Obrazová príloha



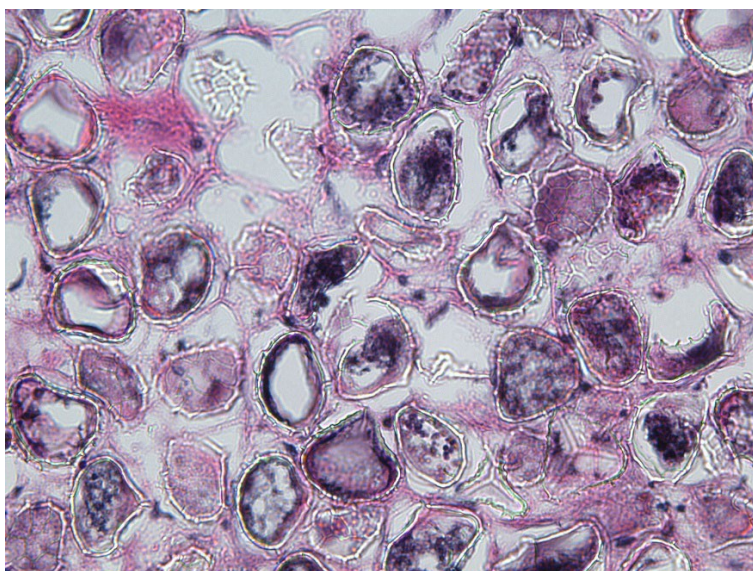
Obr. 1 Excízia z prvej biopsie. Nekróza tukového tkaniva podkožia. V centre fibrinoidná nekróza cievy s tvorbou trombu. (HE, obj. 20x)



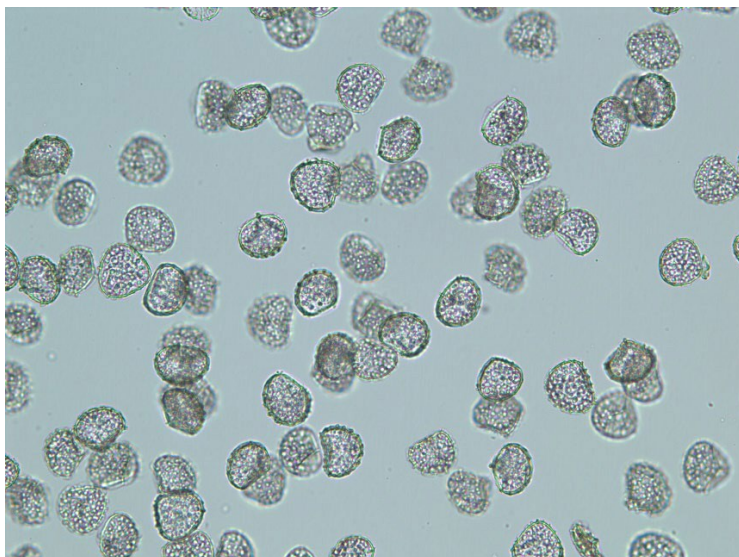
Obr. 2 Excízia z druhej biopsie. Okraj chronického vredu predkolenia. Vred je ohraničený epidermou. V centre nekróza, v spodine vertikálne proliferované cievy. (HE, obj. 20x)



Obr. 3 Nález arteficiálnych štruktúr v nekrotickej debris povrchu ulkusu (HE, obj. 10x)



Obr. 4 Detail sférických štruktúr obsahujúcich bodkové čiastočky, ohraničené hrubou membránou, niekde s ostrými výbežkami na povrchovej vrstve (HE, obj. 40x)



Obr. 5 Natívny preparát výtrusov Plavúňa obyčajného (obj. 10)

Adresa prvého autora:

MUDr. Petra Kolenčíková, PhD.

Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM

Kollárova 2

036 59 Martin

Optimalizácia ddPCR analýzy na detekciu metylácie v promótorovej oblasti génu CDH13

Samec, M.¹, Samec, I.², Péč, M.^{1*}, Péčová, R.³, Baranová, I.³,
Dvorská, D.⁴, Danková, Z.⁵, Franecková, M.¹

¹ Ústav lekárskej biológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

² Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

³ Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

⁴ Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

⁵ Biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

* korešpondenčný autor

prof. MUDr. Martin Péč, PhD., MPH

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Univerzita Komenského v Bratislave

Ústav lekárskej biológie

Malá Hora 4

036 01 Martin

tel: +421 43 2633 440 e-mail: martin.pec@uniba.sk

Abstrakt

DNA metylácia je biologický proces zahŕňajúci pridanie metylových skupín k DNA. Jej dysregulácia je najčastejšie pozorovanou udalosťou v nádorových bunkách. Kadherín-13 (CDH13), ktorý hrá zásadnú úlohu pri adhézii medzi bunkami a potlačovaní nádorov, vykazuje dysreguláciu spojenú s rôznymi typmi rakoviny, pričom aberantná metylácia často inhibuje jeho tumor-supresívnu funkciu. Výber vhodných nástrojov na posúdenie úrovne metylácie DNA je nevyhnutný pre následné klinické implementácie. Dropletová digitálna PCR (ddPCR) je vysoko citlivá, presná a reprodukovateľná technológia na presnú kvantifikáciu nukleových kyselín vo vzorkách. Cieľom tejto štúdie je optimalizovať metylačne špecifickú ddPCR esej na presné rozlíšenie medzi metylovanou a nemetylovanou promótorovou oblasťou génu CDH13 v klinických vzorkách.

Kľúčové slová: metylácia, ddPCR, návrh primerov, rakovina

Úvod

Epigenetika predstavuje rýchlo sa rozvíjajúcu oblasť biológie, zameranú na štúdium zmien génovej expresie, ktorá nie je spôsobená zmenou v poradí nukleotidov v molekule DNA, ale zmenou v chemických modifikáciách DNA a proteínov (Farsetti et al., 2023). Tieto hereditárne zmeny vznikajú počas bunkového cyklu a delenia buniek, čo vedie k rozdielnym profilom génovej expresie, aj keď primárna sekvencia DNA zostáva rovnaká. Zlyhanie vo fungovaní epigenetického aparátu môže viesť ku zmene génovej expresie, čo môže následne iniciovať vznik karcinogenézy. Nedávne výskumy v oblasti epigenetických modifikácií preukázali, že rakovinové bunky, okrem genetických zmien pozorovaných pri malígnej transformácii, vykazujú aj globálne epigenetické zmeny. Metylácia DNA je jednou z najviac skúmaných epigenetických modifikácií, pri ktorej dochádza k metylácii 5. uhlíka (C5) pyrimidínového kruhu cytozínu, čo vedie k vzniku 5-metylcytozínu (Jjingo et al., 2012). Táto modifikácia prebieha najmä na miestach cytozín-fosfát-guanín (CpG), ktoré sú lokalizované v promótorových oblastiach tumor supresorových génov (TSG). Transkripcia génov začína v promótorových oblastiach, ktoré sú charakterizované relatívne vysokou koncentráciou CpG dinukleotidov (Klose and Bird, 2006). Aberantne metylované CpG ostrovy sú preto v súčasnosti považované za sľubné prognostické a prediktívne markery spojené s rozvojom rakoviny. Kadherin 13 (CDH13), tiež označovaný ako H-kadherín alebo T-kadherín, predstavuje atypického člena rodiny kadherínov. Tento gén je lokalizovaný na chromozóme 16 a hrá zásadnú úlohu pri adhézii bunka-bunka (Ye et al., 2017). Inaktivácia tejto kadherín-sprostredkovanej bunkovej adhézie z dôvodu zníženia génovej expresie môže viesť ku rozvoju malígnej transformácie (Baranová et al., 2024). Abnormálna metylácia CDH13 je často identifikovaná u rôznych typov nádorových ochorení (Lin et al., 2014; Shao et al., 2022; Ye et al., 2017). Re-expresia génu CDH13 je spojená s potlačením invazivity, rastu nádoru a neovaskularizácie v mnohých in vitro a in vivo experimentálnych štúdiách. Z tohto dôvodu by sa účinný skrining a včasná, presná detekcia aberantne metylovanej promótorovej oblasti CDH13 mohla použiť ako sľubný diagnostický a prognostický marker pre rôzne nádorové ochorenia. Detekcia metylačného stavu DNA v jednotlivých génoch je rýchlo sa rozvíjajúcou oblasťou molekulárnej medicíny, ktorá ponúka potenciál rozlišovať medzi rôznymi typmi nádorov a predpovedať ich odpoveď na chemoterapeutickú intervenciu vzhľadom na ich špecifický metylačný profil (Khodadadi et al., 2021). V súčasnosti je k dispozícii niekoľko technológií na určenie metylačného stavu vzoriek DNA, ktoré sú založené na princípe bisulfitovej modifikácie, biologickej identifikácie alebo reštrikčnej analýzy. Výber vhodnej metódy na určenie metylačného profilu špecifických promótorových oblastí jednotlivých TSG s vysokou špecifickosťou, citlivosťou a nákladovou efektívnosťou je rozhodujúci pre získanie zásadných experimentálnych údajov ako aj následnú klinickú aplikáciu. Digitálna kvapôčková PCR (ddPCR) predstavuje metódu, ktorá umožňuje presnú detekciu a kvantifikáciu cieľovej DNA. Táto metóda umožňuje rozlíšiť zmeny v DNA s

361 TTCTAGTCGGACAAAATGCAGCCGAGAACTCCGCTCGTTC
 ||:||||++||:||||:|:++||||:|:+++:++||:
 361 TTTTAGTCGGATAAAATGTAGTCGAGAAATTCGTCGTTT

Posledný krok dizajnu eseje spočíval v použití voľne dostupného softvéru na návrh primerov Primer3 (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), určeného na výber špecifických na metylácii nezávislých primerov s metylovanými sondami (označenými FAM-BHQ1) a nemetylovanými sondami (označenými HEX-IBFQ). Naše navrhnuté sondy cieľili na tri blízke CpG miesta (chr16:82,626,843; chr16:82,626,845; chr16:82,626,859) v promótorovej oblasti génu CDH13. Sekvencie primerov a sond sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Sekvencie primerov a sond pre detekciu metylácie promótorovej oblasti CDH13.

Primery	
Názov	sekvencia (5'→3')
CDH13 Forward	AAAGAAGTAAATGGGATGTTATTTTC
CDH13 Reverse	ACCAAAACCAATAACTTTACAAAAC
Próby	
Názov	sekvencia
CDH13 metylovaná próba (FAM-BHQ1)	TCGCGAGGTGTTTATTTTCGT
CDH13 nemetylovaná próba (HEX-IBFQ)	TTTTGTGAGGTGTTTATTTTGTATTTGT

Optimalizácia PCR podmienok

Na optimalizáciu sond pre metylované (M-Próba, FAM) a nemetylované (UnM-Próba, HEX) sekvencie bola použitá platforma ddPCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Ako kontrolnú DNA pre optimalizačné kroky sme použili komerčne dostupné plne metylované a plne nemetylované

kontroly EpiTect DNA (Qiagen, Hilden, Nemecko). Reakčná zmes pre ddPCR obsahovala 10 μ l Supermix for Probes bez dUTP (Bio-Rad Laboratories), 0,45 μ l každého primeru, 0,45 μ l každej sondy, 1 μ l metylovanej a nemetylovanej kontrolnej DNA, a 7,75 μ l vody, čím sa dosiahol finálny objem 20 μ l. 70 μ l oleja na generovanie kvapiek spolu s reakčnou zmesou bolo vložených do kazety DG8 a následne do generátora kvapiek QX200 (Bio-Rad Laboratories), kde sa každá vzorka rozdelila na približne 20 000 kvapiek. Po vytvorení olejovej emulzie sa približne 40 μ l vzorky prenieslo do 96-jamkových PCR platní, ktoré boli pokryté prepichovateľnou fóliou a tepelne zatavené pomocou systému Bio-Rad PX1. Prvý optimalizačný krok ddPCR testu zahŕňal stanovenie optimálnych PCR podmienok. Teplotný program PCR pozostával z aktivácie enzýmu po dobu 10 minút pri 95 °C, nasledovanú 40 cyklami denaturácie po dobu 30 sekúnd pri 94 °C, a krok anelácie/predĺženia počas 1 minúty s teplotným gradientom, zakončený jedným cyklom deaktivácie enzýmu počas 10 minút pri 98 °C. Pre optimalizáciu podmienok anelácie sme vykonali teplotný gradient v rozmedzí 50 – 62 °C. Na záver sme vložili platničku do čítačky kvapiek QX200 (Bio-Rad Laboratories) na finálnu analýzu.

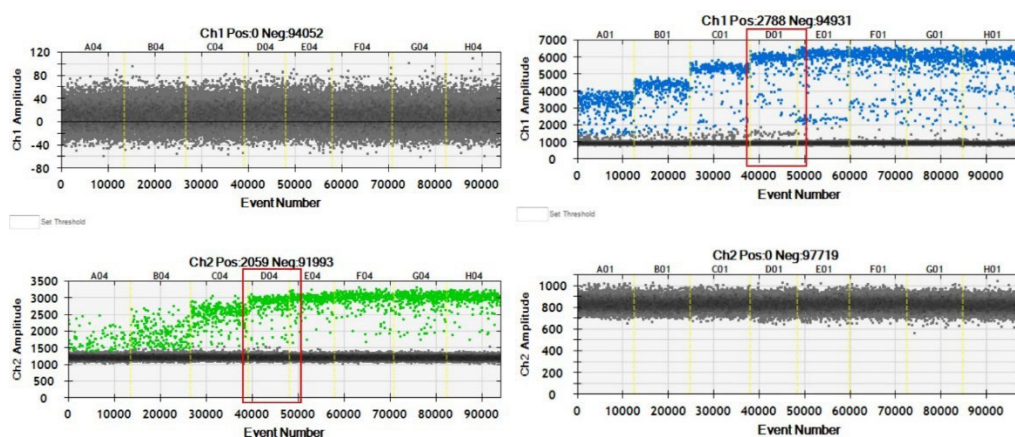
Koncentračný gradient

Druhým optimalizačným krokom bola realizácia koncentračného gradientu ôsmich rôznych riedení kontrolných DNA, aby sme potvrdili dynamický rozsah a linearitu metódy. Reakčná zmes pre ddPCR obsahovala 10 μ l Supermix for Probes (bez dUTP) (Bio-Rad Laboratories), 0,45 μ l každého primeru, 0,45 μ l každej sondy, zriedenú metylovanú a nemetylovanú DNA a variabilný objem vody až do konečného objemu 20 μ l. Teplotný program PCR a následná analýza prebiehala rovnako ako bolo uvedené vyššie.

Výsledky

Stanovenie optimálnych podmienok PCR reakcie

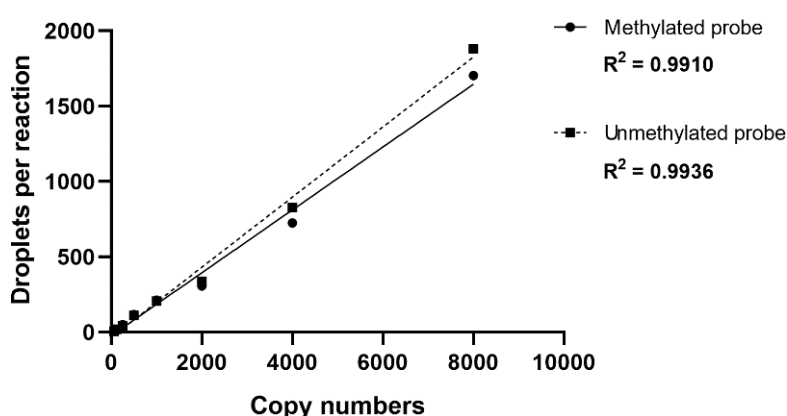
Pomocou komerčne dostupnej metylovanej a nemetylovanej DNA sme stanovili optimálnu teplotu anelácie na 57 °C pre sondy detegujúce metylované aj nemetylované sekvencie (obr. 2; červené rámečky). Obe kontrolné DNA boli testované s próbou špecifickou pre metylované aj nemetylované sekvencie. Nemetylovaná sonda (obr. 2, vpravo hore) vykazovala vysokú senzitivitu pri detekcii nemetylovanej DNA a zároveň dokonalú selektivitu. Aj v prípade metylovanej sondy (obr. 2, vľavo dole) sme zaznamenali vysokú senzitivitu na detekciu metylovanej kontrolnej DNA, bez prítomnosti skríženej reaktivity.



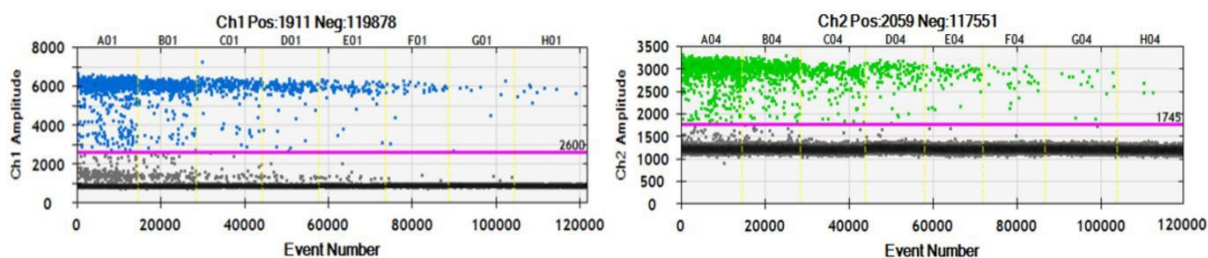
Obrázok 2. Optimalizácia teplotných podmienok PCR pre metylovanú príbu a nemetylovanú príbu

Koncentračný gradient

Do koncentračného gradientu bolo zahrnutých osem rôznych riedení kontrol DNA, aby sa potvrdili dynamický rozsah a linearita metódy (obr. 3). Na riedenie sa použila metylovaná a nemetylovaná DNA kontrola. Podobne ako pri optimalizácii podmienok PCR reakcie, boli obe kontroly kombinované s metylovanou a nemetylovanou sondou. Nami získané dáta preukázali linearitu s R^2 hodnotami na úrovni 0,9910 (pre metylovanú príbu) a 0,9936 (pre nemetylovanú príbu). Optimálna koncentrácia bola stanovená na základe amplitúdy signálu, celkového počtu pozitívnych kvapiek a väzbovej špecificity. Okrem toho boli prahové hodnoty stanovené na úrovni 2600 pre FAM a 1745 pre HEX (obr. 4). Tieto hodnoty boli určené na základe výsledkov koncentračného gradientu, pričom do úvahy sa opäť brali amplitúda, celkový počet pozitívnych dropletov a špecificita väzby.



Obrázok 3. Linearita metódy pre kvantifikáciu metylácie CDH13



Obrázok 4. Koncentračný gradient: dvojnásobné riediace série metylovanej (vľavo) a nemetylovanej kontrolnej DNA (vpravo), zriedené od 8000 do 62 kópií na reakciu.

Diskusia

Epigenetické zmeny, vrátane aberantnej metylácie DNA, sú v súčasnosti uznávané ako charakteristické znaky malígnej transformácie, ktoré sú asociované s iniciáciou a progresiou rakoviny, s odpoveďou na terapiu, ako aj s rozvojom rezistencie. Metylácia promótorových oblastí génov môže mať celý rad dopadov na riziko vzniku rakoviny, klinickú stratifikáciu a terapeutické výsledky (Geissler et al., 2024). Rozvoj a optimalizácia nových prístupov na analýzu špecifických metylačných paternov prináša nové možnosti spojené s analýzou onkologických ochorení a predstavuje nádejný koncept pre následnú klinickú implementáciu. Platforma ddPCR umožňuje presnú detekciu a absolútnu kvantifikáciu cieľových sekvencií DNA (Mao et al., 2019). Využitie DNA ošetrenej bisulfitom sodným a následná aplikácia špecifických sond pre metylované a nemetylované sekvencie je vhodné na kvantifikáciu metylovanej DNA s jednobázovým rozlíšením práve s využitím tejto platformy. V našej štúdii sme navrhli špecifické a senzitívne eseje zamerané na promótorovu oblasť génu CDH13. Na identifikáciu promótoru génu CDH13 sme použili biologickú databázu promótorových oblastí EPD. Kritický krok v analýze metylácie DNA s použitím metód na princípe PCR predstavuje návrh primerov a prób, ktoré špecificky rozoznávajú cieľové oblasti génu. V súčasnosti existuje niekoľko dostupných online nástrojov ako je BiSearch, MSPprimer alebo MethPrimer (Marek et al., 2024). V našom výskume sme použili MethPrimer na realizáciu digitálnej bisulfitovej konverzie vstupnej sekvencie s predpovedanými CpG ostrovmi. Na návrh primerov pre amplifikáciu bisulfitovo modifikovanej DNA sme použili voľne dostupný softvér Primer3 (Untergasser et al., 2012). Tento softvér sme tiež využili na návrh sond v dvoch variantoch na rozlíšenie metylačného profilu. Nami navrhnuté metylačné špecifické sondy rozpoznávali tri CpG miesta nachádzajúce sa v oblasti promótoru génu CDH13. Optimalizáciou podmienok PCR reakcie sme identifikovali optimálnu teplotu anelácie pre metylovanú a nemetylovanú próbu ako aj ich špecificitu k metylovanej resp. nemetylovanej DNA. Dôležitým krokom optimalizácie každej diagnostickej eseje je stanovenie linearitu analytickej metódy. Nami získane údaje preukázali linearitu na úrovni vyššej ako 0,99 pre obe próby.

Na záver je potrebné zdôrazniť fakt, že využitie metód molekulárnej biológie na analýzu zmien metylačného vzoru DNA umožňuje identifikovať špecifické metylačné profily, čo môže prispieť k stanoveniu prognózy ochorenia a výberu optimálnej terapie. V našej práci sme optimalizovali ddPCR esej zameranú na identifikáciu metylovaných CpG dinukleotidov v promótorovej oblasti génu CDH13. Optimalizáciou PCR podmienok sme zabezpečili schopnosť tejto eseje rozpoznať metylovanú a nemetylovanú sekvenciu DNA. Taktiež sme preukázali linearitu navrhutej eseje, čo predstavuje dôležitý faktor každej analytickej metódy.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0286/22.

Použitá literatúra

- Arroyo K, Nargizyan A, Andrade FG, et al. Development of a Droplet Digital™ PCR DNA methylation detection and quantification assay of prenatal tobacco exposure. *BioTechniques*. Future Science; 2022 Apr;72(4):121–33.
- Baranová I, Samec M, Dvorská D, et al. Droplet digital PCR analysis of CDH13 methylation status in Slovak women with invasive ductal breast cancer. *Scientific Reports*. 2024 Jun 26;14:14700.
- Farsetti A, Illi B, Gaetano C. How epigenetics impacts on human diseases. *European Journal of Internal Medicine*. 2023 Aug;114:15–22.
- Geissler F, Nesic K, Kondrashova O, et al. The role of aberrant DNA methylation in cancer initiation and clinical impacts. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* [Internet]. 2024 Jan 28;16:17588359231220511.
- Jjing D, Conley AB, Yi SV, et al. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*. Impact Journals; 2012 May 9;3(4):462–74.
- Khodadadi E, Fahmideh L, Khodadadi E, et al. Current Advances in DNA Methylation Analysis Methods. *BioMed Research International*. 2021 Mar 20;2021:8827516.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006 Feb 1;31(2):89–97.
- Lin Y-L, Xie P-G, Ma J-G. Aberrant Methylation of CDH13 is a Potential Biomarker for Predicting the Recurrence and Progression of Non Muscle Invasive Bladder Cancer. *Medical Science Monitor*. International Scientific Information, Inc.; 2014 Sep 4;20:1572–7.
- Mao X, Liu C, Tong H, et al. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translational Research* [Internet]. 2019 Dec 15;11(12):7209–22.
- Marek S, Ivana B, Iryna Z, et al. Optimizing Droplet Digital PCR Assay for Precise Assessment of MEIS1 Gene Promoter Methylation. *Acta Medica Martiniana* [Internet]. 2024 Apr 27;24(1):21–8. Shao Y, Li

W, Zhang L, et al. CDH13 is a prognostic biomarker and a potential therapeutic target for patients with clear cell renal cell carcinoma. *American Journal of Cancer Research*. 2022 Oct 15;12(10):4520–44.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2012 Aug;40(15):e115.

Ye M, Huang T, Li J, et al. Role of CDH13 promoter methylation in the carcinogenesis, progression, and prognosis of colorectal cancer: A systematic meta-analysis under PRISMA guidelines. *Medicine*. 2017 Jan;96(4):e5956.

Pozitívne a negatívne aspekty mentorstva študentov ošetrovateľstva

Lepiešová M¹, Zanovitová M¹, Procházková J², Blštáková L¹.

1. Ústav ošetrovateľstva, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave
2. Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Nedostatok sestier je vážnym problémom súčasného zdravotníctva. Mentorstvo zohráva významnú úlohu pri zabezpečení kvalitného priebehu ošetrovateľských praxí v profesionálnej príprave budúcich sestier. Cieľom kvalitatívnej štúdie bolo identifikovať pozitívne a negatívne aspekty mentorstva z perspektívy študentov ošetrovateľstva, sestier-mentorov a vedenia vybraného klinického pracoviska. Na základe tematickej analýzy dát získaných prostredníctvom individuálneho pološtruktúrovaného rozhovoru a ohniskových skupín, sme identifikovali deväť tém reflektujúcich názory a skúsenosti 15 participantiek. Medzi pozitívne aspekty mentorstva patrili pocit istoty, profesionalita, trpezlivosť mentora a integrácia študenta do tímu, prispievajúce k rozvoju klinických kompetencií a formovaniu profesionálnej identity. Negatívne aspekty zahŕňali nedostatok času na študenta, stres a finančné ohodnotenie mentorov. Na základe zistení odporúčame optimalizovať organizáciu praktickej výučby a zabezpečiť podmienky pre mentorstvo s cieľom zvýšiť jeho efektivitu a udržateľnosť. Zistenia štúdie potvrdzujú potrebu udržať súčasnú úroveň odbornej prípravy a podpory sestier-mentorov a posilniť oblasti vyžadujúce zlepšenie. Efektívne mentorstvo je pre kvalitnú prípravu budúcich sestier nevyhnutné, s perspektívou pozitívneho vplyvu na stabilizáciu personálnych kapacít v zdravotníctve.

Kľúčové slová: nedostatok sestier, ošetrovateľstvo, profesionálna príprava, mentorstvo, tematická analýza

Úvod

Ošetrovateľstvo je kľúčovým pilierom zdravotnej starostlivosti, pričom sestry tvoria najpočetnejšiu profesijnú skupinu v zdravotníctve. Dlhodobý nedostatok sestier sa prehlbuje v dôsledku starnutia populácie, vysokého pracovného zaťaženia i medzinárodného náboru, čo vedie k „odlivu mozgov“ a oslabeniu personálnych kapacít (Ondrušová et al., 2023). Okrem odchodu skúsených sestier sa problém týka aj študentov, ktorí predčasne opúšťajú štúdium pre nedostatočnú pripravenosť, nízku sebadôveru či nepriaznivé pracovné podmienky.

Súčasná situácia ešte viac akcentuje potrebu kvalitnej profesionálnej prípravy budúcich sestier. Regulácia profesie sestry na medzinárodnej a národnej úrovni vyžaduje k získaniu odbornej

spôsobilosti pre výkon povolania sestry u nás absolvovanie 4600 hodín celkovej výučby s požiadavkou 60 % praktickej výučby. Prevažná časť výučby prebieha v reálnom klinickom prostredí vo forme klinických a praktických predmetov a ošetrovateľských praxí. Efektívnosť ošetrovateľskej praxe závisí od organizácie a vedenia študentov, pričom významnú úlohu pri jej zabezpečení zohráva mentorstvo. Požiadavka spoluúčasti sestier z klinickej ošetrovateľskej praxe na profesionálnej príprave študentov ošetrovateľstva, napríklad formou mentorstva, je reflektovaná v oddieloch 4, 6 a 7 Európskej stratégie SZO pre vzdelávanie sestier a pôrodných asistentiek (Nurses and Midwives..., 2000) a odporúčaniami pre jej implementáciu (Nurses and Midwives..., 2001), v Koncepcii zdravotnej starostlivosti v odbore ošetrovateľstvo (2023) i v zozname klinických kompetencií sestier, t.j. rozsahu ošetrovateľskej praxe určenom príslušnou vyhláškou, kde je v rámci rozsahu činností sestry vymedzená aj jej spolupráca na odbornej príprave študentov zdravotníckych odborov (Vyhláška MZ SR č. 208/2024 Z. z.).

Mentorstvo je osvedčenou stratégiou na riešenie deficitu sestier, podporuje rozvoj klinických kompetencií, sebadôvery a profesionálnej identity študentov (Gularte-Rinaldo et al., 2022). Pomáha pri ich integrácii do zdravotníckych tímov, zlepšuje tímovú spoluprácu a podporuje zotrvanie v profesii (Hagrass et al., 2023). Pre organizácie znamená efektívnejšiu adaptáciu nových zamestnancov a nižšiu fluktuáciu sestier (Schroyer et al., 2016).

Napriek výhodám mentorstvo prináša aj výzvy – kvalita vzťahu mentor–študent je kľúčová pre úspech procesu. Nedostatočná podpora môže viesť k nespokojnosti, demotivácii či predčasnému ukončeniu štúdia (Cinová et al., 2019). Mentorstvo vyžaduje spoluprácu vzdelávacích inštitúcií a zdravotníckych zariadení, aby bolo efektívne a v konečnom dôsledku prispievalo k stabilizácii sestier v systéme zdravotnej starostlivosti.

Cieľ práce

S ohľadom na potreby vzdelávacej inštitúcie, ktorá v plnej miere implementuje mentorstvo do bakalárskeho študijného programu ošetrovateľstva, sme realizovali pilotnú štúdiu zameranú na všetky zainteresované strany tohto procesu. Na Jesseniovej lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Martine (JLF UK) je mentorstvo integrované do súvislej odbornej praxe študentov ošetrovateľstva v každom ročníku a do semestrálnej ošetrovateľskej praxe študentov posledného, tretieho ročníka. Zvolili sme kvalitatívny výskum s deskriptívnym dizajnom s cieľom identifikovať pozitívne a negatívne aspekty mentorstva z perspektívy študentov, sestier-mentorov a vedenia pracoviska klinickej výučby. Za pilotné pracovisko realizácie výskumu sme vybrali Neonatologickú kliniku Univerzitnej nemocnice Martin (UNM), ktorá má dlhoročné skúsenosti s individuálnym mentorstvom. Jeho výber podporil aj zvýšený záujem a zaradenie sestier danej kliniky do programu sústavného vzdelávania Mentor klinickej praxe v odbore ošetrovateľstvo na JLF UK (PSV Mentor...), ako aj vyšší počet študentov posledného ročníka, ktorí na klinike absolvovali ošetrovateľskú prax pod vedením mentorov – čo

prebiehalo v úzkej súčinnosti s cieľom pomôcť klinike implementovať stratégie na stabilizáciu personálnych nedostatkov.

Výskumný súbor

V súlade s cieľom štúdie sme zámerným výberom oslovili participantov – študentov ošetrovateľstva, sestry-mentorov a vedúcu sestru Neonatologickej kliniky UNM. Na základe súhlasu vedenia kliniky sme kontaktovali všetkých sedem sestier-mentorov evidovaných v databáze mentorov UNM. Pre študentov sme použili homogénny výber s využitím adaptovanej metódy snehovej gule (Naderifar et al., 2017). Študentka tretieho ročníka, zaradená na súvislú odbornú prax na danej klinike, sprostredkovala informácie o výskume svojim spolužiačkam, ktoré tu rovnako absolvovali svoju prax. Inkluzívne kritériá pre študentov zahŕňali: štúdium v bakalárskom študijnom programe ošetrovateľstva na JLF UK, absolvovaná prax pod individuálnym vedením sestry-mentora na Neonatologickej klinike UNM, ochota zúčastniť sa výskumu. Pre sestry-mentorov boli kritériami: pracovná pozícia na danej klinike, absolvovaný PSV Mentor... na JLF UK, skúsenosť s individuálnym mentorstvom aspoň jedného študenta, ochota zúčastniť sa na výskume. Exkluzívnym kritériom bolo odmietnutie účasti na výskume.

Po získaní informovaného súhlasu vzorku tvorilo 15 participantov, rozdelených do dvoch skupín:

- Študenti (n = 7): sedem študentiek tretieho ročníka bakalárskeho štúdia ošetrovateľstva na JLF UK (Š1–Š7), ktoré absolvovali klinickú ošetrovateľskú prax pod vedením sestier-mentorov na Neonatologickej klinike UNM.
- Sestry (n = 8): vedúca sestra (S1) a sedem sestier-mentoriek (S2–S8) pracujúcich na danej klinike.

Zber a analýza dát

Zber dát prebiehal vo februári až marci 2024 v seminárnej miestnosti danej kliniky prostredníctvom pološtruktúrovaného rozhovoru a ohniskových skupín. Predchádzalo mu získanie súhlasu s realizáciou výskumu zo strany vedenia kliniky a Ústavu ošetrovateľstva JLF UK (ÚOSE JF UK), príprava informovaných súhlasov pre participantov, protokolu rozhovoru a scenára ohniskových skupín s nosnými a doplňujúcimi otázkami. Otázky boli otvoreného charakteru, orientované na pozitívne a negatívne aspekty mentorstva, vzťahu medzi mentorom a študentom a vplyv mentorstva na prípravu študentov na výkon povolania.

Ohnisková skupina je kvalitatívnou výskumnou metódou, pri ktorej moderátor vedie skupinovú diskusiu s cieľom získať názory účastníkov na konkrétnu tému. Medzi jej výhody patrí efektívne získavanie rozsiahleho množstva údajov v krátkom čase, schopnosť odhaliť zdroje komplexného správania a motivácie účastníkov, možnosť pozorovať ich neverbálne reakcie v rámci skupinovej dynamiky a interakcie (Jayasekara, 2012; Doody et al., 2013).

Zber dát sme začali individuálnym rozhovorom s vedúcou sestrou kliniky (45 min.), po ňom nasledovali dve ohniskové skupiny – každá so špecifickou homogénnou podskupinou, so študentkami (105 min.) a sestrami-mentorkami (100 min.).

Záznam rozhovoru bol uskutočnený diktafónom a záznam oboch ohniskových skupín dvoma statickými kamerami. Získané dáta boli následne spracované a analyzované jednotlivými krokmi tematickej analýzy podľa autoriek Braunovej a Clarkovej (2006, 2013). Zahŕňala doslovný prepis nahrávok do textovej podoby v programe MS Word 2010, prevod kľúčových pasáží (extraktov) do programu MS Excel pre ich jednoduchšiu manipuláciu a systematické spracovanie, kategorizáciu dát formou kódovania, identifikáciu vzorcov a následnú syntézu do subtém a hlavných tém (obr. 1), ich analýzu a interpretáciu (Braun & Clarke, 2006, 2013).

CR	Citácia	Kód	Charakteristika	Subtéma	Téma
2	"pre mňa je to to, že nachádzam v mentorovi istotu, keď som si nie istá nejakým výkonom. Vie, že je tu pre mňa a že ma neodsúdi, keď niečo neviem."	Pozitívum	Nachádzanie istoty v mentorovi	Istota	Istota
3	"Mám sa o koho oprieť, cítim sa istejšie. Ja som si veľakrát nie istá a potrebujem nad sebou niekoho, kto mi povie „áno, takto to máš urobiť"	Pozitívum	Cítiť sa istejšie s mentorom	Istota	Istota
4	"Najväčšie pozitívum je pre mňa to, že mentori mi dodali sebavedomie a sebaistotu pri výkonoch. Aj stokrát sme opakovali veci, ktoré mi nešli, až som si nakoniec bola istá a vedela som, ako to robiť správne"	Pozitívum	Zvýšenie sebavedomie a sebaistoty	Istota	Istota
5	"Ja som mala iba dobré skúsenosti. Teraz mám úžasnú mentorku. Veľmi dobre sa mi s ňou spolupracuje. Veľmi ma motivuje. Ja mám problém s kanylami. Veľakrát sa mi to nepodarí a ona ma vždy podporí, môžem sa vždy na ňu obrátiť, všetko mi poradí. Chodím na prax rada a som strašne spokojná. Cítim sa prijato v kolektíve, lebo aj ostatný	Pozitívum	Zvýšenie podpory a sebaistoty	Istota	Istota
7	"Ja mám pozitívnych skúseností strašne veľa. Vždy som mala úžasných mentorov. Najviac vo mne rezonuje to, že keď som mala problém zobrať venóznou krv, tak mentorka aj tridsaťkrát išla so mnou a podporila ma. A potom ma to aj naučila a uistila ma v tom. Dodávala mi odvalu a motiváciu. To je podľa mňa kľúčové. Nemám žiadnu negatívnu skúsenosť."	Pozitívum	Zvýšenie podpory a sebaistoty	Istota	Istota

Obrázok 1 Proces tematickej analýzy v programe MS Excel

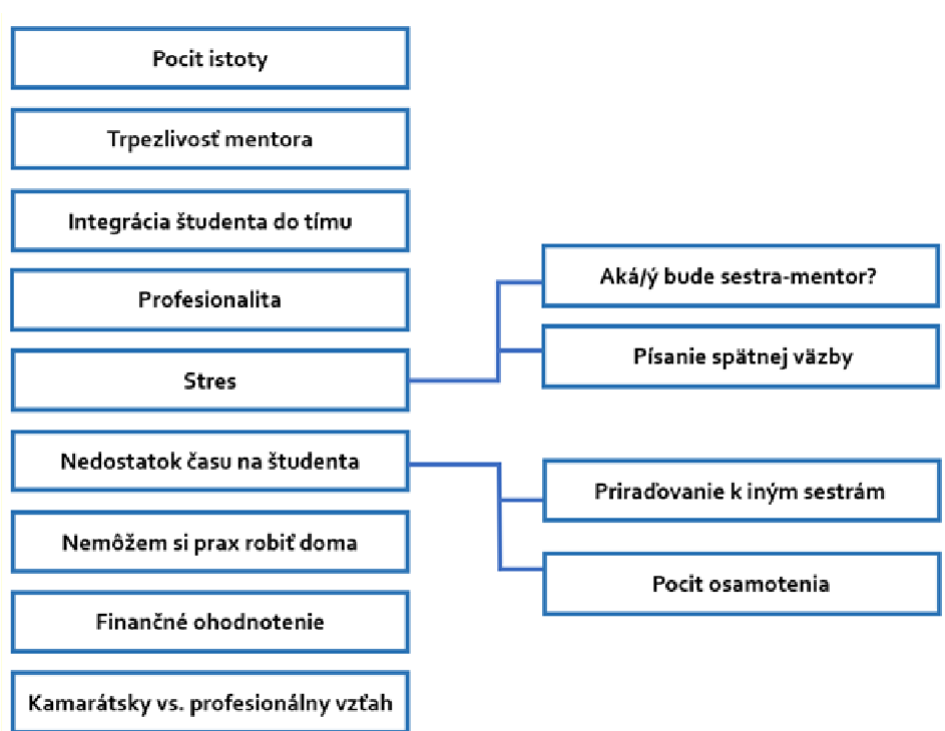
Výsledky

Tematickou analýzou sme identifikovali deväť hlavných tém reflektujúcich pozitívne a negatívne aspekty mentorstva z perspektívy participantiek štúdie: Pociť istoty, Trpezlivosť mentora, Integrácia študenta do tímu, Profesionalita, Stres (so subtémami Aká/ý bude sestra-mentor? a Písanie spätnej väzby), Nedostatok času na študenta (so subtémami Priradovanie k iným sestrám a Pociť osamotenosti), Nemôžem si prax robiť doma, Finančné ohodnotenie, a Kamarátsky vs. profesionálny vzťah.

Pozitívne aspekty mentorstva reflektujú témy Pociť istoty, Trpezlivosť mentora a Integrácia študenta do tímu, ktoré sú podporené odpoveďami študentiek, sestier-mentoriek aj vedúcej sestry. Téma Profesionalita zdôrazňuje pozitívny vplyv mentorstva na pripravenosť študentov na profesiu sestry. Všetky participantky vnímajú profesionalitu ako pozitívne, želané a očakávané implikácie mentorstva. Témy Stres, Nedostatok času na študenta, Nemôžem si prax robiť doma a Finančné ohodnotenie reprezentovali negatívne aspekty mentorstva vyjadrené študentkami. Sestry-mentorky negatíva spájali predovšetkým s témou Nedostatku času na študenta a Finančného ohodnotenia.

Téma Kamarátsky vs. profesionálny vzťah sa dotýka očakávaného vzťahu medzi sestrou-mentorom a študentom ošetrovateľstva a obsahovo rámcuje vyjadrenia participantiek z oboch skupín.

Pre väčšiu prehľadnosť výsledky prezentujeme v schéme (obr. 2) a pri interpretácii jednotlivých tém a subtém ich dopĺňame výrokmi participantiek.



Obrázok 2 Pozitívne a negatívne aspekty mentorstva študentov ošetrovateľstva – identifikované témy a subtémy

Pocit istoty

Participantky oboch skupín radili pocit istoty medzi hlavné pozitíva mentorstva a považovali ho za nevyhnutný pre úspešné zvládnutie predpísanej praxe. Študentka Š2 vyjadrila: „Pocit istoty nachádzam v mentorovi, keď si nie som istá výkonom... viem, že ma podporí.“ Š4 dodala: „Mám sa o koho oprieť, cítim sa istejšie. Potrebujem niekoho, kto mi povie: áno, takto to máš urobiť...“ Š6 uviedla: „Pre mňa je hlavné mať istotu... a keď viem, že sa na neho [mentora] môžem obrátiť, keď sa niečo deje.“ Rovnako Š7 sa vyjadrila: „Najväčšie pozitívum je pre mňa to, že mentori mi dodali sebavedomie a sebaistotu pri výkonoch. Aj stokrát sme opakovali veci, až som si nakoniec bola istá a vedela som, ako to robiť správne.“ Z pohľadu sestier-mentoriek, ako S6, je tento pocit veľmi dôležitý: „Vzájomne sa spoznávame, vzniká dôvera, odbúrava sa strach a stres u študenta, ktorý sa na praxi postupne cíti istejšie.“ Pocit istoty je pre študentov kľúčový, pričom sestry-mentorky považujú jeho upevňovanie u študenta za nevyhnutné.

Trpezlivosť mentora

Trpezlivosť bola ďalším pozitívom mentorstva, ktoré vyzdvihli obe strany. Študentka Š1 v tejto súvislosti uviedla: „Myslím si, že mentormi by mali byť mladšie sestry, lebo majú viac trpezlivosti.“ Š2 vysvetľovala: „Pre mňa je dôležité, keď mi mentorka pomáha a hlavne je trpezlivá.“ Sestra-mentorka S3 vyjadrila, že počas mentorského kurzu sa naučila byť trpezlivejšia: „Keď som trpezlivejšia, je pre študentov jednoduchšie učiť sa...“ Rovnako S2 uvádza: „Musím byť trpezlivá, a zmieriť sa s tým, že výkon, ktorý by som spravila za pár minút, nám trvá dlhšie...“ Študentky považujú trpezlivosť za nevyhnutnú podmienku dobrého vzťahu medzi študentom a mentorom, sestry-mentorky rozumejú jej dôležitosti, a snažia sa ju pri vedení študenta aktívne uplatňovať.

Integrácia študenta do tímu

Zaradenie študenta do tímu bolo ďalším pozitívom mentorstva, ktoré akcentovali študentky aj sestry-mentorky. Študenti v tíme získavajú sebadôveru, rozvíjajú svoj potenciál pre tímovú prácu, cítia sa byť užitoční a vnímajú svoju prax ako zmysluplnú. Študentka Š4 uviedla: „Páči sa mi, keď ma mentor zaradí do tímu a chodu oddelenia. Vtedy mám pocit, že im naozaj pomáham a som im užitočná. Cítim sa taká docenená a... že to, čo robím, má zmysel.“ Podobne reagovala Š1: „Keď ma mentor zaradí do tímu, som... istejšia, nemám stres z tej praxe. Teraz takú prax zažívam a je to najlepšie za celé štúdium...! Strašne sa tam cítim dobre – keď vykonávam sesterskú robotu a neprezliekam celý deň posteľ, alebo nedezinfikujem plochy.“ Š5 ocenila, keď ju mentor hneď predstaví celému tímu: „...nebola som len nejaký študent, ktorý zavadzia, ale vedeli o mne aj ostatní... cítim sa prijato v tom tíme, lebo aj ostatní prejavujú o mňa záujem.“ Sestry-mentorky rovnako vnímajú integráciu študenta do tímu ako prínosnú. S4 uviedla: „Snažím sa vždy zaradiť moju študentku do tímu... Pracuje sa mi potom ľahšie, lebo keď riešim niečo dôležité, viem, že ostatní jej pomôžu.“ S5 doplnila: „V tíme má každý svoje úlohy... keď tam zaradím študenta, tak aj on bude mať svoje... Cíti sa potom docenený, že mu dôverujeme.“ Integrácia študenta do tímu, opakovane reflektovaná participantkami ako pozitívum mentorstva, posilňuje jeho sebaistotu, aktivitu a prijatie kolektívom.

Profesionalita

Participantky oboch skupín označili profesionalitu za významný dopad mentorstva na prípravu študentov na povolanie sestry. Študentky si uvedomujú, že bez mentorov by nenadobudli taký rozsah klinických spôsobilostí, a sú im za ich vedenie vďačné. Študentka Š1: „Neviem si predstaviť prax bez mentora. Asi by som bola stratená, hodená do vody... Stala som sa istejšou vo výkonoch, robím ich lepšie, mám pocit, že sa zdokonaľujem. Mentori vo mne budujú profesionalitu.“ Š3 doplnila: „Fakt môžeme byť radi, že máme mentorov. Aj keď niekedy na to nadávame... ale neviem si to bez nich predstaviť. Presne ten pocit profesionality mám aj ja... že dokážem už tak prepájať si veci, spájať súvislosti, chápať...“ Š6 ocenila prínos mentorstva: „Ja som zo začiatku bola taká, že... Načo pôjdeme

na prax pod mentorov?! Po čase som zistila, že to je naozaj dobré a máme veľkú výhodu oproti školám, ktoré mentora nemajú. Vždy ma tak začlenili, že... cítila som sa ako taký malý profesionál, ktorý sa každou službou zlepšuje. Už len kvôli mentorstvu sú naše praxe prínosnejšie ako na iných školách." Profesionalitu reflektovali aj sestry. Vedúca sestra S1 uviedla: „Prínosom mentorstva je profesijný rozvoj, jednak sestier ale aj študentov, ktorí majú potenciál a rozvíjajú svoju profesionalitu." S8 vyjadrila: „Študenti sú vďaka mentorom profesionálnejší, ako keby boli bez nich..."

Stres

Pocit stresu sa objavoval ako najčastejšie uvádzané negatívum mentorstva, predovšetkým u študentiek. Tie počas svojich praxí pod individuálnym mentorstvom zažívali stres z rôznych dôvodov. Najčastejšie opisovali stres z prvého stretnutia s mentorom, stres z jeho osobnosti či ochoty spolupracovať, ale aj stres súvisiaci s požiadavkou napísať na svojho mentora spätnú väzbu, najmä pri problematickom priebehu praxe. Na základe výpovedí sme tému rozdelili na dve subtémy: Aká/ý bude sestra-mentor? a Stres z písania spätnej väzby.

Aká/ý bude sestra-mentor?

Študentky najviac diskutovali stres v spojitosti s prvým stretnutím s pridelenou sestrou-mentorom, stres z jeho/jej osobnostných charakteristík a správania. Š1: „Ten stres, že ku komu budem priradená..? Najväčší stres mám aj z toho, keď idem na prvú službu, či nebude [mentor] nervózny alebo výbušný." Podobne sa vyjadrovali aj ďalšie študentky – Š2: „Keď neviem, do čoho idem a čo môžem očakávať, ja mám až také motýliky v bruchu..."; Š4: „Stres z toho, že bude [mentor] taký neprístupný – s takým by sa mi asi ťažko pracovalo."; Š5: „Určite je to stres, keďže neviem, o koho ide... ja si vždy pozerám na Facebooku, ako ten mentor vyzerá, či sa na fotkách usmieva... niekedy si spravím prvý dojem z fotiek... nie vždy je to dobré, lebo skutočnosť môže byť iná." Na rozdiel od ostatých, študentka Š6 nepociťuje kvôli mentorstvu stres: „Ja sa nestresujem... Len raz, keď som mala mentora muža, som mala trochu stres, že aký bude, že je to muž... Bola som zvyknutá väčšinou len na sestry – ženy". Sestry-mentorky si uvedomujú stres u študentov a niektoré sa ho snažia zmierniť budovaním dôvery, ako uviedla S5: „... snažím sa o to, aby sme sa navzájom spoznali, aby vznikla medzi nami dôvera a tým som odbúrala jeho stres..." Občas určité situácie a dobre mienené prejavy môžu u študentov tiež vyvolávať neistotu či stres, ako uviedla Š5: „Raz mi mentorka ponúkla tykanie, ale necítila som sa komfortne, mala som z toho stres... radšej som jej vykala. Vnímam ju ako autoritu." Stres z osobnostných čŕt a správania mentorov bol najčastejšie spomínaným negatívom mentorstva. Väčšina študentiek uviedla, že po prvom stretnutí stres opadol, no niektoré mali negatívne skúsenosti, ktoré ovplyvnili celú ich prax, ako Š7: „Na jednej praxi som mala mentorku, ktorá čakala, že budem hneď všetko vedieť sama robiť, už od prvej služby. Keď som nevedela, dávala mi to pociť. Na druhej službe mi už len dávala príkazy. Všetko som robila sama. Dokonca raz odišla pred výmenou služieb a

nechala ma tam samú...! Chodila som domov s plačom, bolo to hrozné! ...Ale toto sa mi stalo iba raz. Našťastie som okrem nej mala vždy super mentorov“.

Písanie spätnej väzby

Na konci ohniskových skupín sme sa participantiek spýtali na ich návrhy pre zlepšenie mentorstva. K požiadavke spätnej väzby formou vzájomného písomného hodnotenia študenta a mentora na konci portfólia mentora sa vyjadrili tri študentky, pričom ostatné súhlasne prikyvovali. Š5: „Nepáči sa mi, že mentor mi musí podpísať moju spätnú väzbu na neho. Potom sa bojím ju napísať úprimne, lebo si ju prečíta... Chápem, že ide o spoločnú spätnú väzbu a možno o nejaké riešenie konfliktov, ale ja to proste neviem povedať do očí...“ Rovnako Š7 uviedla: „Nemohla som objektívne hodnotiť tú hroznú mentorku..., lebo to po mne čítala. Bála som sa a mala som z nej stres. Nemohla som tam napísať pravdu...!“ Študentka Š3: „Mala som raz veľmi zlú mentorku, cítila som sa zle, často som plakala. Na konci praxe som jej chcela napísať objektívnu kritiku, aj keď vedela som, že ju bude čítať... Nakoniec to vyriešila ona, lebo celú spätnú väzbu na mentora mi nadiktovala, takže som tam napísala presne to, čo chcela...“ Všetky participantky zo skupiny študentiek sa zhodli, že spätná väzba na mentora by sa mala písať v súkromí, bez dodatočnej kontroly mentorom. Navrhli, aby sa na konci praxe spätná väzba na mentora poskytovala výhradne škole, pre riešenie prípadných problémov.

Nedostatok času na študenta

Za negatívny aspekt mentorstva participantky oboch skupín považujú nedostatok času na študenta, čo vnímajú ako výrazný problém. Táto téma obsahuje dve subtémy: Priradovanie k iným sestrám a Pocit osamotenía, pričom prvá sa týka presúvania študentov k iným sestrám v službe a druhá ponechania študentov osamotených, bez dohľadu či záujmu svojej sestry-mentora.

Priradovanie k iným sestrám

Štyri študentky pomenovali ako negatívum, keď sestry-mentori nemali čas na ich vedenie, a preto ich priradili k iným sestrám na službe. Aj päť sestier-mentoriek uznáva, že dostatok času pre študenta je pre mentorstvo kľúčovou podmienkou, ale nie vždy ju splňajú. Manažérky dennej smeny, zastúpené v našej subvzorke dvomi mentorkami, priznávajú, že niekedy musia kvôli pracovnej vyťažnosti študentov priradiť k iným sestrám. Študentky označujú takýto prístup za neefektívny – Š4: „Mne sa nepáči, keď mentori, najmä staničné sestry, na nás nemajú čas a priradujú nás k iným sestrám na službe. Tie nie sú mentorky, tak prečo nás majú mať na starosti?!“ Š7 k tomu dodala: „Potom to dopadne tak, že každú službu som s niekým iným...“ V rovnakom zmysle sa vyjadrila Š1: „Veľakrát som sa potom cítila, že len zavadziam a pod nikoho vlastne nepatrím.“ Š6 a Š4 však v tejto súvislosti nechcú generalizovať – Š6: „Ja som mala naopak so staničnou sestrou pozitívnu skúsenosť. Závisí to od človeka, ako si to vie zorganizovať...“; Š4: „Naozaj sa mi moja mentorka, staničná sestra, moc nevenuje, keďže má strašne veľa iných povinností. Ale na ostatné sestry nemôžem povedať ani

jedno zlé slovo. Keď vidia, že mám záujem, tak mi dajú robiť takmer všetko... Sú tam sestry, ktoré sa mi venujú a majú pre mentorstvo obrovské predpoklady, škoda, že to nevyužijú a nejdú do mentorstva." Sestry-mentorky S6 a S3, obe manažérky dennej zmeny („staničné sestry“), sa snažia prispôbiť prácu tak, aby študenti cítili podporu, aj keď S6 priznáva: „Niekedy som nútená prideliť ich k sestrám na službe... niekedy som naozaj v časovej tiesni kvôli ostatným povinnostiam." Vedúca sestra S1 taktiež súhlasí, že nedostatok času a vyťaženie mentorov negatívne ovplyvňujú kvalitu mentorstva, aj preto podporuje myšlienku, aby sa aj ďalšie smenové sestry stali vyškolenými mentormi, čo by pomohlo zredukovať priradovanie študentov k „staničným sestrám".

Pocit osamotenía

Dve študentky opísali negatívne skúsenosti z predchádzajúcej praxe na iných pracoviskách, keď zostali bez dohľadu či vedenia svojich sestier-mentorov, ktoré na ne nemali čas, ochotu či záujem, alebo si ich nevšíмали. Š3 uviedla: „Moja mentorka nemala čas..., boli sme tam sami, nikto si nás nevšímal. Bola to prax o ničom!" Š5 dodala: „Nie je správne, keď sú sestry nútené robiť mentorov a potom to robia neochotne. Potom sme na praxi sami a nič sa nenaučíme..." Obe reflektovali, že takáto prax im neponúkla možnosti učiť sa novým zručnostiam.

Nemôžem si prax robiť doma

Študentky Š1 a Š6 považujú za negatívum aj fakt, že nemôžu vykonávať klinickú prax v mieste svojho bydliska, čo by uvítali. Uvedomujú si, že najviac vyškolených sestier-mentorov je v Univerzitnej nemocnici Martin, a preto apelujú na zvýšenie počtu mentorov aj v iných nemocniciach. Š1: „Bolo by super, keby boli mentori aj v iných nemocniciach, a prax by sme si mohli robiť doma..." Š6 doplnila: „Nepáči sa mi, že nemôžeme praxovať doma, keďže väčšina mentorov je v UNM... Je to potom pre nás, čo sme na internáte, také nekomfortné, lebo aj počas Vianoc sme doma kratšie, niektorí musia chodiť aj medzi sviatkami... a aj cez leto tu musíme byť... Ostatní, čo chodia inam [študenti ošetrovateľstva z iných fakúlt], si to môžu robiť doma! Ja viem, že oni nemajú prax pod mentormi, ale keby sa spravil nejaký nábor a vyškolili by sa mentori v iných nemocniciach, tak by to bolo pre nás študentov dobré."

Finančné ohodnotenie

Počas ohniskových skupín participantky oboch skupín otvorili tému finančného ohodnotenia mentorov. Študentky – Š1: „Mentorstvo pre sestry nie je jednoduché, malo by sa zvážiť ich finančné ohodnotenie a viac kreditov."; Š2: „Dala by som im adekvátne ohodnotenie, je to práca navyše..." ; Š5: „...by som im zvýšila ohodnotenie, majú veľkú zodpovednosť!"; Š4 uvažovala aj iným spôsobom: „Mentori by mali mať vyššie ohodnotenie, ale potom to môže prilákať aj tých, ktorí na to nemajú predpoklady..." Novovyškoľená sestra-mentorka (S2) s prvou skúsenosťou s vedením študenta uviedla: „Neviem, či budem za to zaplatená, ale zaslúžili by sme si to." Rovnako novovyškoľená S5 by

uvítala: „...väčšie vnímanie a váženie si mentoriek, či už medzi kolegyňami alebo v tíme... A nejaké benefity, aby sme neboli vyčerpané... možnosť nejakého plateného voľna, 2-3 dni, alebo vyššie finančné ohodnotenie. Myslím, že inak nebude o mentorstvo záujem, lebo... mentorstvo robíme popri svojej práci.“ Vedúca sestry S1 vyjadrila: „Snažím sa motivovať sestry k účasti na mentorskom programe aj tým, že budú finančne ohodnotené.“

Kamarátsky vs. profesionálny vzťah

Na otázku o očakávanom vzťahu medzi sestrou-mentorom a študentom sa názory participantiek mierne líšili. Študentky očakávali priateľský, kamarátsky vzťah, ktorý je ale postavený na vzájomnom rešpekte. Š2: „Pre mňa je dôležité, keď je mentor kamarátsky. Potom sa teším na prax... Keď je milý, usmievavý, kamarátsky, tak je to super!“ Š3 súhlasila: „Kamarátsky vzťah je dôležitý... Teraz moju mentorku vnímam ako takú autoritu, ale veľmi si rozumieme a veľa sa aj nasmejeme.“ Š4 opísala aj opačnú skúsenosť, ktorá podčiarkuje to, ako sa mentor správať nemá: „Mala som priateľské mentorky, veľmi dobre sa mi s nimi spolupracovalo. A potom... zažila som tú veľmi zlú mentorku, bola strašne povýšenecká a arogantná. Nechápem prečo išla robiť mentorku?! Náš vzťah nebol žiadny. Teda, bol... Ja som sa jej bála a ona si to asi užívala.“ Sestry-mentorky preferovali vzťah, ktorí síce pomenovali ako profesionálny, v kontexte skupinovej diskusie však tiež zdôrazňovali priateľský prístup. S6: „Základom je dôvera, milý a priateľský prístup, ale musíme stále zostať profesionálky.“ S8: „Ja som sa so svojou študentkou snažila navodiť taký profesionálny-priateľský vzťah... A bolo to fajn, fungovalo nám to spolu.“ S5: „Na mentorskom kurze nám radili nebudovať si prehnane kamarátske vzťahy, treba si zachovať profesionálny vzťah.“ Obe skupiny participantiek zdôrazňujú vzájomnú dôveru, pochopenie a rešpekt, pričom študentky očakávajú skôr kamarátsky vzťah a sestry-mentorky sa snažia udržiavať vzťah na profesionálnej úrovni.

Diskusia a záver

Zvýšený počet študentov ošetrovateľstva vyžaduje viac vyškolených sestier-mentorov, ktorí im poskytnú odborné vedenie počas výkonu ošetrovateľskej praxe a pomôžu tak naplniť požiadavky tohto regulovaného povolania. JLF UK v Martine ako jediná na Slovensku ponúka akreditovaný program sústavného vzdelávania Mentor klinickej praxe v odbore ošetrovateľstvo, ktorý pripravuje sestry na rolu mentora. Vyšší počet absolventov tohto programu prispieva k zlepšeniu kvality mentorstva, čím sa zvyšuje aj kvalita profesionálnej prípravy budúcich sestier. Ošetrovateľská prax študentov bakalárskeho študijného programu ošetrovateľstvo na JLF UK v Martine je v rámci semestrálnych ošetrovateľských praxí v poslednom ročníku a súvislých odborných praxí v každom ročníku vedená vyškolenými sestrami-mentormi formou individuálneho mentorstva a v súlade s požiadavkami školy. V niektorých prípadoch sú sestry-mentori zodpovední aj za hodnotenie výkonu

študentov v zhode so stanovenými kritériami školy. Tento proces prebieha vo vzájomnej súčinnosti všetkých zainteresovaných strán už viac ako 15 rokov. Sústavne sa usilujeme o jeho optimalizáciu a zlepšovanie, aj preto realizujeme výskumné štúdie, ktoré nám umožňujú identifikovať kľúčové oblasti vyžadujúce zlepšenie a modifikáciu na základe spätnej väzby a aktuálnych potrieb praxe. Predkladaná kvalitatívna výskumná štúdia sa zaoberá hodnotením pozitív a negatív mentorstva študentov ošetrovateľstva, pričom sa zameriava na skúsenosti študentov, sestier-mentorov a zástupcov vedenia (vedúca sestra) pracovísk klinickej výučby – pilotne sme vychádzali z podmienok Neonatologickej kliniky UNM. Participantky zo subvzorky študentiek však pri diskusiách o pozitívnych a negatívnych aspektoch mentorstva reflektovali aj predchádzajúce skúsenosti s mentorstvom na iných pracoviskách a s inými sestrami-mentormi. Identifikované témy reprezentujúce pozitíva a negatíva mentorstva z perspektívy participantiek nášho súboru, sú v súlade s výsledkami zahraničných výskumných štúdií.

Pozitívnym aspektom mentorstva, ktorý považujú naše participantky za jeden z najvýznamnejších, je pocit istoty. Hauge et al. (2019) vo svojej štúdii uvádzajú, že pocit istoty je pre zlepšenie kvality učenia a výkonu študentov ošetrovateľstva kľúčový, preto je potrebné vytvárať bezpečné prostredie, v ktorom sa študenti cítia pri učení a vykonávaní ošetrovateľských výkonov komfortne. Rovnako Frøiland et al. (2023) zdôrazňujú význam mentora pri posilňovaní sebadôvery a zvyšovaní istoty študentov počas klinickej praxe.

Ďalšou témou identifikovanou ako pozitívum mentorstva, bola trpezlivosť mentora. Študentky vyjadrili, že schopnosť mentora byť trpezlivý pomáha študentom rýchlejšie sa adaptovať, cítiť sa sebavedomejšie, prispieva tak k efektívnosti učenia a pocitu pohody na klinickej praxi. Autori Smith et al. (2024) prezentujú, že trpezlivosť mentora je jednou z najdôležitejších charakteristík, ktoré ovplyvňujú učenie študentov a ich rozvoj. Zistili tiež, že trpezliví mentori zlepšujú efektívnosť vzdelávacieho procesu. Podobne Jacobsen et al. (2022) uvádzajú, že vyššia úroveň trpezlivosti mentora vedie k lepšiemu vzdelávaniu študentov a zvyšovaniu ich angažovanosti v procese učenia. Téma, ktorá v štúdii pozitívne rezonovala, bola integrácia študenta do tímu. Viacerí študenti uviedli, že sa cítili vítaní a vnímaní ako súčasť tímu, čo malo pozitívny vplyv na rozvoj ich praktických zručností a schopnosti spolupracovať s ostatnými členmi zdravotníckeho tímu. Zaradenie do tímu sa ukazuje ako cenná skúsenosť pre študentov ošetrovateľstva, ktorá im pomáha lepšie porozumieť práci sestry a rozvíjať zručnosti tímovej spolupráce. Autori Smith et al. (2024) zistili, že integrácia do tímu zlepšuje praktické zručnosti a podporuje sociálnu a profesijnú integráciu študentov. Na druhej strane, niektorí študenti pociťovali stres a tlak z neefektívnej komunikácie a problémov v tímovej dynamike. Tieto faktory môžu viesť k negatívnym skúsenostiam, ako opisujú Bogo et al. (2012), ktorí varujú pred negatívnymi následkami, ak študenti v tíme nedokážu efektívne komunikovať alebo sa cítia v tíme izolovaní.

Ďalším významným aspektom mentorstva je profesionalita. Študenti považujú rozvoj profesionality za kľúčový aspekt mentorstva, pričom sa domnievajú, že prítomnosť kvalitného mentora zvyšuje ich schopnosť vykonávať ošetrovateľské činnosti s vyššou úrovňou profesionality. Autori Makhaya et al. (2023) vo svojom výskume zdôrazňujú, že kvalitné mentorstvo pomáha študentom rozvíjať praktické zručnosti a teoretické vedomosti a posilňuje ich profesionalitu.

Stres bol v prieskume identifikovaný ako negatívny faktor mentorstva. Študenti pociťujú stres z rôznych dôvodov, ako sú osobnostné charakteristiky mentora, napísanie spätnej väzby a iné nepriaznivé okolnosti. Li et al. (2011) poukazujú na negatívne účinky stresu, ktoré môžu ovplyvniť motiváciu a sebavedomie študentov. Onieva-Zafra et al. (2020) akcentujú, že nakoľko je vzťah medzi študentom a mentorom kľúčový pre profesijný rozvoj, je dôležité minimalizovať stres, ktorý môže mať dlhodobé negatívne dopady na profesijnú spokojnosť a kariérny rast študentov.

V rámci negatívnych aspektov mentorstva bol identifikovaný aj nedostatok času, ktorý majú sestry-mentori na vedenie študentov počas klinickej praxe. Študenti niekedy pociťujú, že ich mentori nemajú dostatok času na individuálne mentorstvo, čo vedie k negatívnym skúsenostiam. Čas na efektívne vedenie študentov zvyšuje kvalitu mentorstva a podporuje rozvoj študentov ošetrovateľstva.

Na základe zistení našej štúdie, najmä pomenovaných negatívnych aspektov týkajúcich sa organizácie mentorstva študentov ošetrovateľstva na JLF UK v Martine, navrhujeme nasledujúce konkrétne odporúčania pre vzdelávanie a prax:

- vzdelávanie (JLF UK – garant a lektori mentorského programu, vedenie ÚOSE JF UK a garanti predmetov ošetrovateľskej praxe pod supervíziou mentorov): podporiť otvorenú komunikáciu medzi študentmi a sestrami-mentormi v procese vzájomnej spätnej väzby a hodnotenia praxe v portfóliu mentora; podporiť otvorenú komunikáciu v rámci tripartity študent – mentor – garant predmetu v procese mentorstva, najmä pri riešení konfliktov medzi študentom a mentorom alebo pri problémoch počas praxe.; zvýšiť dôraz na písomnú spätnú väzbu v portfóliu mentora v rámci mentorského programu; naďalej posilňovať komunikáciu s cieľovými skupinami v zmysle ponuky programu Mentor klinickej praxe v odbore ošetrovateľstvo aj pre sestry v ďalších regiónoch či iných zdravotníckych zariadeniach (okrem UNM) s cieľom zvýšiť počet vyškolených sestier-mentorov; prehodnotiť priradovanie študentov k sestrám-mentorom vo funkcii manažérov dennej smeny;
- prax (sestry-mentori vo svojich organizáciách): iniciovať diskusie o možnostiach finančného ohodnotenia sestier-mentorov (prípadne jeho prehodnotenia) s manažmentom; navrhnúť nefinančné motivačné činitele v rámci systému odmeňovania; motivovať (ďalšie) sestry k absolvovaniu akreditovaného programu PSV Mentor... na JLF UK (napr. na Neonatologickej klinike UNM aj na základe pozitívnych ohlasov študentiek nášho súboru).

Záverom konštatujeme, že aj keď mentorstvo v ošetrovateľstve prináša mnohé výhody, je dôležité identifikovať a riešiť aj negatívne aspekty vnímané jednotlivými stranami tohto procesu. Snahou by

malo byť znižovanie negatívnych vplyvov v rámci nastavených procesov, aby sa plne využil potenciál mentorstva a maximalizoval jeho prínos pre študentov ošetrovateľstva.

Použitá literatúra

- Bogo M. et al. Toward understanding meta-competence: An analysis of students' reflection on their simulated interviews. *Social Work Education*. 2012; 32(2):259-273.
- Braun V. & Clarke V. Using thematic analysis in psychology. *Qualitative Research in Psychology*. 2006;3(2):77-101.
- Braun V. & Clarke V. Successful qualitative research: A practical guide for beginners. SAGE Publications Ltd. 2013.
- Cinová J, et al. Absolvovanie klinickej ošetrovateľskej praxe z pohľadu vysokoškolských študentov. *Sapere Aude*. 2019; Spoločnosť a profesie učiteľa. Hradec Králové: Magnanimitas:28-30.
- Doody O, Slevin E, Taggart L. Preparing for and conducting focus groups in nursing research: part 2. *Br J Nurs*. 2013 Feb;22(3):170-3.
- Frøiland C T, et al. A digital educational resource to support and enhance effective mentorship practices of nursing students in nursing homes: a qualitative study. *BMC Nurs*. 2023;22:423.
- Gularte-Rinaldo J, Baumgardner R, Tilton T, Brailoff V. Mentorship ReSPeCT Study: A Nurse Mentorship Program's Impact on Transition to Practice and Decision to Remain in Nursing for Newly Graduated Nurses. *Nurse Lead*. 2022 Aug 14;21(2):262–267.
- Hagrass H M, et al. Effect of an educational program about mentorship competencies on nurse mentors' performance: a quasi-experimental study. *BMC Nurs*. 2023;22:429.
- Hauge K W, et al. Are Norwegian mentors failing to fail nursing students? *Nurse Educ Pract*. 2019 Mar;36:64-70.
- Jayasekara R. Focus groups in nursing research: methodological perspectives. *Nurs Outlook*. 2012 Nov-Dec;60(6):411-6.
- Jacobsen T I, et al. Student nurses' experiences participating in a peer mentoring program in clinical placement studies: A metasynthesis. *Nurse Educ Pract*. 2022 May;61:103328.
- Koncepcia zdravotnej starostlivosti v odbore ošetrovateľstvo zo dňa 23.januára 2023 č. 09209-2023-OOIZP podľa § 45 ods. 1 písm. a) zákona č. 576/2004 Z. z. o zdravotnej starostlivosti, službách súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov. *Vestník MZ SR* 2023, čiastka 7-11, str. 34-39.

Li H C, et al. The effect of a peer-mentoring strategy on student nurse stress reduction in clinical practice. *Int Nurs Rev.* 2011 Jun;58(2):203-10.

Makhaya T S, et al. Factors influencing the clinical mentoring of nursing students at a hospital in the North West Province. *International Journal of Africa Nursing Sciences.* 2023;19.

Naderifar M, Goli H, Ghaljaie F. Snowball Sampling: Purposeful Method of Sampling in Qualitative Research. *Strides Dev Med Educ.* 2017 September; 14(3):e67670.

Nurses and Midwives for Health. A WHO European Strategy for Nursing and Midwifery Education. [online]. [cit. 2025-01-31]. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2000 (document EUR/00/5019309/15). 24 p. ISBN 92-890-1171-8. Dostupné na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/107689/9789289011716-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Nurses and Midwives for Health. WHO European Strategy for Nursing and Midwifery Education. Section 1 – 8. Guidelines for Member States on the implementation of the strategy. [online]. [cit. 2025-01-31]. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2001 (document EUR/01/5019304). 165 p. ISBN 92-890-1191-2. Dostupné na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/108405/9789289011914-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ondrušová A, Poliaková N, Matišáková I, Krajčovičová Z, Zverbíková J. Migrácia sestier a zdravotníckych pracovníkov v globálnom meradle. *Zdravotnícke listy.* 2023; 11(1):83-88.

Onieva-Zafra M D, et al. Anxiety, perceived stress and coping strategies in nursing students: a cross-sectional, correlational, descriptive study. *BMC Med Edu.* 2020;20:370.

Schroyer C C, Zellers R, Abraham S. Increasing Registered Nurse Retention Using Mentors in Critical Care Services. *Health Care Manag (Frederick).* 2016 Jul-Sep;35(3):251-65.

Smith E J, et al. Research in action-developing and evaluating a student research placement experience. *Nurse Educ Today.* 2024 Feb;133:106049.

Vyhláška MZ SR č. 208/2024 Z.z. z 15. júla 2024, ktorou sa určuje rozsah ošetrovateľskej praxe poskytovanej sestrou samostatne, samostatne na základe indikácie lekára a v spolupráci s lekárom a rozsah praxe pôrodnej asistencie poskytovanej pôrodnou asistentkou samostatne, samostatne na základe indikácie lekára a v spolupráci s lekárom.

Primárny nodálny „double hit“ difúzny veľkobunkový B-lymfóm (dh dlbcl) imitujúci primárny dlbcl cns (pcnsl)

Mičák, J.^{1,2}, Barthová, M.¹, Janáková Ľ.^{1,2}, Plank, L.^{1,2}

¹ Ústav patologickej anatómie JLF UK a Univerzitnej nemocnice Martin,

prednosta prof. MUDr. Plank Lukáš, CSc.,

² Konzultačné centrum biopctickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK UNM

Abstrakt

Difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL) je u väčšiny pacientov potenciálne kurabilné ochorenie, preto je dôležité identifikovať podskupiny s agresívnejším klinickým priebehom a horšou prognózou, najmä tzv. „double hit“ DLBCL (DH DLBCL) a primárny DLBCL CNS (PCNSL). DH DLBCL charakterizovaný súčasnými translokáciami C-MYC a BCL2 alebo BCL6 génu je zvyčajne asociovaný s rezistenciou k štandardnej chemoterapii.

CIEĽOM prezentovaného prípadu je poukázať na potrebu komplexného prístupu v diagnostike agresívnych lymfómov, vrátane potreby doplnenia adekvátnych klinických údajov.

MATERIÁLY A METÓDY: Analyzované boli dve biopsie pacienta s lymfómom CNS. V prvej biopsii z TU intraspínálne s fraktúrou a infiltráciou lumbálneho stavca (L1), veľké blastické elementy vykazovali tzv. non-GCB DLBCL fenotyp s veľmi vysokou proliferáčnou aktivitou, ktorý svedčil pre diagnózu DLBCL miechy. Druhá biopsia z TU mozgu v oblasti BG ukázala identický histomorfologický obraz a podobný fenotyp, navyše s prídutím pozitívnej bcl2 a bcl6 proteínovej expresie. Nádor predstavoval relaps DLBCL v CNS a fenotypovo favorizoval PCNSL. Retrospektívne získané informácie o pacientovi ukázali, že ochorenie bolo už pri prvej biopsii diseminované (IV. klinické štádium), pacient dostával intenzívnu chemoterapiu a absolvoval aj autológnu transplantáciu krvotvorných buniek. Táto liečba viedla ku kompletnej remisii až do relapsu, pričom pacient mesiac po relapse zomrel. Biopsie boli retrospektívne analyzované metódami FISH. Prvá biopsia vykazovala zlom v lokuse C-MYC, 5' deléciu v lokuse BCL6 a prítomnosť IGH/C-MYC fúzií. V druhej biopsii bola detegovaná identická 5' delécia v lokuse BCL6 a zlom v lokuse IGH, pričom lokus C-MYC a BCL2 bol bez prestavby.

ZÁVER: Nádor pôvodne hodnotený ako PCNSL predstavoval diseminovaný DH DLBCL s postihnutím CNS, ktorý bol aj napriek intenzívnej terapii a transplantácii KD asociovaný so zlou prognózou. Finálna diagnóza teda predstavuje „puzzle“ všetkých dostupných údajov.

Kľúčové slová: „double hit“ difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DH DLBCL), primárny difúzny veľkobunkový B-lymfóm (PCNSL), fluorescenčná in-situ hybridizácia (FISH)

Úvod

Difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL) predstavuje heterogénnu skupinu agresívnych nádorov, ktorá sa v súčasnej SZO klasifikácii nádorov krvotvorby a lymfatického systému (z r. 2017) stratifikuje na viacero skupín, resp. podskupín s rozdielným stupňom agresivity a tým aj rozdielnou prognózou. DLBCL je u väčšiny pacientov potenciálne kurabilné ochorenie, avšak časť pacientov na štandardnú liečbu neodpovedá alebo relabuje. Z prognostického a terapeutického hľadiska je preto dôležité identifikovať aj podskupiny s agresívnejším klinickým priebehom a horšou prognózou (Le Gouill et al., 2007; Niitsu et al., 2009). V spektre DLBCL patria k takýmto podskupinám najmä „double hit“ DLBCL (DH DLBCL) a primárny DLBCL CNS (PCNSL). DH DLBCL je charakterizovaný konkurentnými translokáciami C-MYC a BCL2 génu (DH C-MYC a BCL2), menej často aj BCL6 génu (DH C-MYC a BCL6). Ide o vysoko agresívne nádory s veľmi nepriaznivou prognózou (prežívanie skôr v mesiacoch ako v rokoch), ktoré sú rezistentné k štandardnej terapii, často postihujú extranodálne lokality, obzvlášť CNS a majú vysoké riziko relapsu (Aukema et al., 2011; Savage et al., 2009). PCNSL vznikajúci primárne v mozgu, mieche alebo v oku je v spektre klasifikácie nádorov krvotvorby a lymfatického systému podľa SZO (2017) zaradený ako samostatná a klinicky agresívna nozologická jednotka s nepriaznivou prognózou. Väčšina pacientov zomiera v priebehu dvoch rokov a 5-ročné celkové prežívanie pacientov je 4-40% (Damek et al., 2003; Ferreri et al., 2007). Morfológicky je tvorený pruhmi a agregátmi blastov (prevažne centro- a imunoblastov) s črtami angiocentrizmu. Nádorové bunky sú pozitívne pri dôkaze CD20 a CD79a znaku a typicky vykazujú pozitívnu expresiu MUM1 proteínu (pribl. 90% prípadov), pričom expresia CD10 znaku je zriedkavá (10-20% prípadov). Blasty sú zvyčajne pozitívne pri dôkaze bcl6 a bcl2 proteínu, typicky bez asociácie s translokáciou t(14;18)(q32;q21) (Swerdlow et al., 2017; Camilleri-Broet et al., 2006).

Materiály a metódy

V rámci konzultačného bioptického vyšetrenia boli k nám zaslané vo forme parafínových blokov dve biopsie pacienta s lymfómom CNS: prvá biopsia z tumoru (TU) intraspínálne s fraktúrou a infiltráciou lumbálneho stavca (L1) a druhá biopsia z TU mozgu v oblasti bazálnych ganglií (BG) vľavo.

Pacient

Išlo o 45 ročného muža s arteriálnou hypertenziou, diabetes mellitus 2. typu na PAD a B-bunkovým non-Hodgkinovým lymfómom (NHL) typu DLBCL v pokročilom klinickom štádiu (IV. B), ako aj s vysokým rizikom medzinárodného prognostického indexu (IPI 4). Pacient mal iniciálne retroperitoneálnu lymfadenopatiu s prerastaním nádoru do miechového kanála v oblasti lumbálnej a sakrálnej chrbtice s kompresívnou fraktúrou a infiltráciou stavca L1. Taktiež mal infiltrované semenníky a slezinu. Pacient absolvoval RT (TD 30 Gy) na oblasť hrudnej a lumbálnej chrbtice, ako aj na oblasť semenníkov (TD 24 Gy). Dostával liečbu podľa protokolu GMALL (nemecký protokol na liečbu akútnej lymfoblastovej leukémie a BL), intratekálnu profylaxiu a absolvoval autológnu transplantáciu krvotvorných buniek. Pacient dosiahol podľa PET kompletnú remisiu. O jeden rok bol prijatý na neurochirurgickú kliniku s 2 týždňovou anamnézou bolesti hlavy, zhoršenia zraku, diplopie a neostrým videním. Na CT a MR vyšetrení bol nález nápadnej heterogénnej infiltrácie lokalizovanej v oblasti BG vľavo. Realizovaná stereotaktická biopsia potvrdila, že ide o relaps základného ochorenia v mozgu. Pacientovi bola indikovaná paliatívna RT. Klinický stav pacienta sa však postupne zhoršoval a na realizovanom CT vyšetrení bol nález progresie ochorenia aj v mozgovom kmeni. Napriek nasadenej liečbe, pacient po mesiaci od diagnostikovaného relapsu pre progresiu základného ochorenia exitoval.

Histomorfologická a imunohistochemická (IHC) analýza

Z obdržaných parafrínových blokoch boli narezané štandardné tkanivové rezy farbené panelom základných a špeciálnych histologických farbiacich metód (hematoxylín a eozín, Giemsa, PAS reakcia, impregnácia podľa Gomoriho) a pomerne širokým panelom IHC vyšetrení (protilátky proti znakom CK/KL1, EMA, CD20, CD3, CD10, bcl2, bcl6, MUM1, CD138). Vzorky boli spracované deparafinizáciou a revitalizáciou tkaniva v prístroji PTLINK (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dánsko), podľa typu použitej protilátky aj s použitím Target Retrieval Solution Low ph (ph = 7), Target Retrieval Solution High ph (ph = 9) alebo EDTA (ph = 9) a to pri 96 °C počas 20 min. IHC farbenie sa uskutočnilo pomocou automatického imunostainera (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dánsko). Cut-off hranica pozitívnej expresie jednotlivých proteínov bola stanovená podľa odporúčania výrobcu a podľa odborných publikácií. V prípade expresie znaku CD10, Bcl6 a MUM1 sme podľa Hansovej et al., (2004) nádor považovali za pozitívny pre príslušný znak, ak vykazovalo pozitivitu aspoň 30% nádorových buniek. Získané výsledky boli odčítavané na mikroskope Olympus BX41 nezávisle 3 patológmi. Závery vyšetrení boli navzájom porovnávané a následne štatisticky vyhodnotené.

Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)

Obe biopsie boli analyzované aj metódami fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH). FISH analýza sa vykonala na parafínových rezoch s hrúbkou 3 µm na podložných sklách Superfrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Nemecko), ktoré boli spracované prostredníctvom Histology FISH Accessory Kit (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dánsko) Metódou FISH sme vyšetrili nasledovné abnormality:

- 1.) prestavba IGH/C-MYC génov s použitím LSI IGH/MYC, CEP8 Tri Color dual Fusion Translocation (Abbott/Vysis) sondy;
- 2.) stav lokusu C-MYC (8q24) s použitím LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement (Abbott/Vysis) sondy;
- 3.) stav lokusu BCL2 (18q21) s použitím LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement (Abbott/Vysis) sondy;
- 4.) stav lokusu BCL6 (3q27) s použitím LSI BCL6 Dual Color Break Apart Rearrangement (Abbott/Vysis) sondy;
- 5.) stav lokusu IGH (14q32) s použitím LSI IGH Dual Color Break Apart Rearrangement (Abbott/Vysis) sondy.

Preparáty boli odčítané s využitím fluorescenčného mikroskopu Olympus BX61WI (Olympus Corporation, Tokyo, Japonsko) vybaveného kamerou CCD-1300QLN (Vosskühler GmbH, Osnabrück, Nemecko). Fluorescenčné signály boli snímané a hodnotené pomocou počítačového softvéru pre analýzu obrazu LUCIA Cytogenetics2 (Laboratory Imaging s. r. o., Praha, Česká republika). Hodnotených bolo minimálne 100 interfáznych jadier. Hraničná hodnota pozitivity (cut-off level) bola stanovená na základe odborných publikácií na $\geq 5\%$ nádorových buniek pre vyšetrenie zlomovou sondou a na $\geq 10\%$ nádorových buniek pre vyšetrenie fúznou sondou.

Výsledky

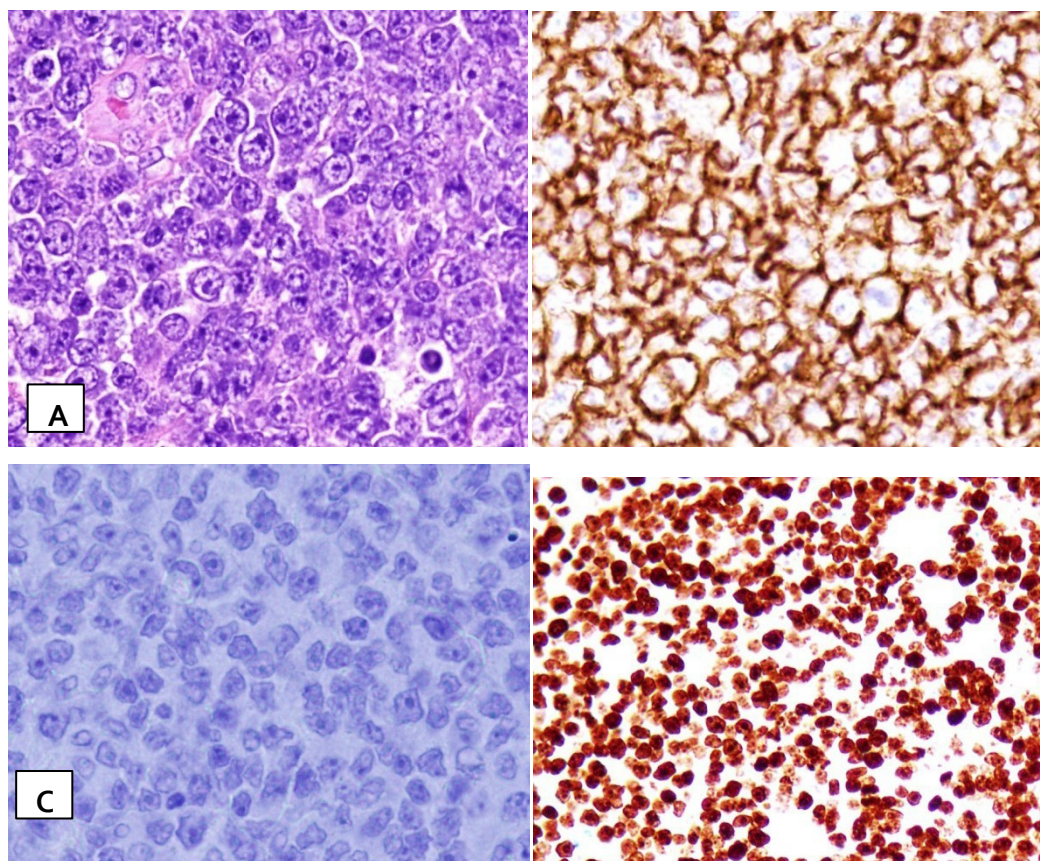
Histomorfologická a imunohistochemická (IHC) analýza

Biopsia č.1.

Mikroskopicky išlo o fragmenty nádorového infiltrátu „blastického vzhľadu“ s neistou pozitivitou CD45 antigénu podľa pôvodne priloženého IHC preparátu. Histocytologicky tvorili nádorový infiltrát kohezívne a mitoticky vysoko aktívne blasty, ktoré v prvej sérii našich IHC vyšetrení vykazovali fenotyp CD20+, CD3-, bcl2-, CK/KL1- a EMA-. Prípado bol predbežne uzavretý ako CD20+/bcl2- blastický B-NHL, histomorfologicky na rozhraní Burkittovho lymfómu (BL) a DLBCL, preto sme pokračovali ešte vo vyšetreniach. Dodatočným vyšetrením sme zistili, že nádorové bunky okrem už vyššie uvedeného vykazovali nasledovné znaky: CD10-, bcl6-, CD138- a vysokú proliferáciu aktivitu (index Ki-67) viac ako 90 % (obr. 1, tab.1). Prípado sme po komplexnom zhodnotení uzatvorili ako

infiltráciu miechy v oblasti stavca L1 CD20+ blastickým B-NHL zo spektra DLBCL, morfológicky centroblastový variant, fenotypovo podľa algoritmu Hansovej et al., (2004) non-GCB podskupina.

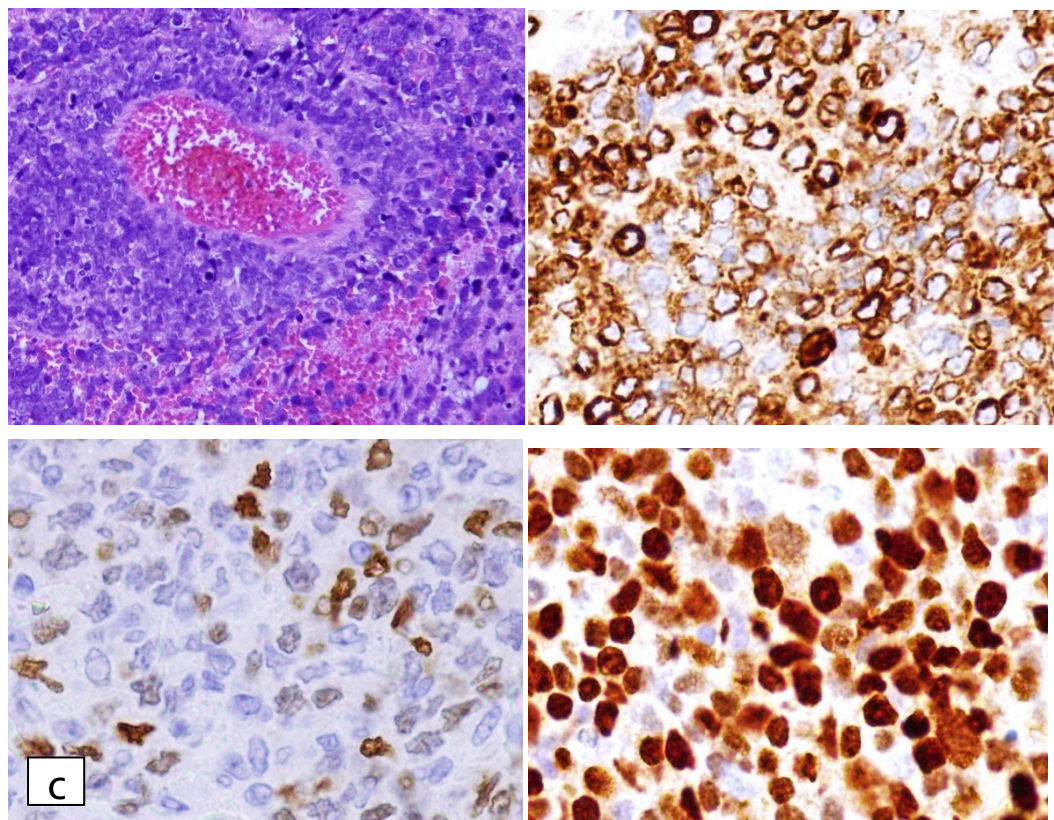
Obr. 1. Biopsia č. 1 – histomorfologická a imunohistochemická (IHC) analýza: A) nádorový infiltrát vzhľadu centroblastov (H&E x 40); IHC sú nádorové bunky pozitívne pri dôkaze antigénu CD20 (B, x 60) a negatívne pri dôkaze antigénu CD10 (C, x 40) a vykazujú vysokú proliferáciu (index Ki-67) (D, x 20).



Biopsia č.2.

Mikroskopicky išlo v tomto prípade o fragmenty mozgového tkaniva, v ktorých boli ložiská perivaskulárne akcentovanej blastickéj nádorovej lymfoproliferácie s fenotypom CD20+, CD10-, bcl2+, bcl6 a MUM1+ vo viac ako 70% buniek, ktorej proliferácia (index Ki-67) bola nad 90% (obr. 2, tab. 1). Prípado sme uzatvorili ako infiltráciu mozgu nami v minulosti (v r. 2009) v oblasti lumbálnej miechy verifikovaným CD20+ blastickým B-NHL typu DLBCL, ktorého fenotyp zodpovedá PCNSL.

Obr. 2. Biopsia č. 2 – histomorfologická a imunohistochemická (IHC) analýza: A) ložisko blastickéj lymfoproliferácie s väzbou na cievy (H&E x 10); IHC sú nádorové bunky pozitívne pri dôkaze antigénu bcl2 (B, x 40), bcl6 (C, x 40), MUM1 (D, x 40).



Tab. 1. Porovnanie výsledkov imunohistochemickej (IHC) analýzy v biopsii č.1 a č. 2..

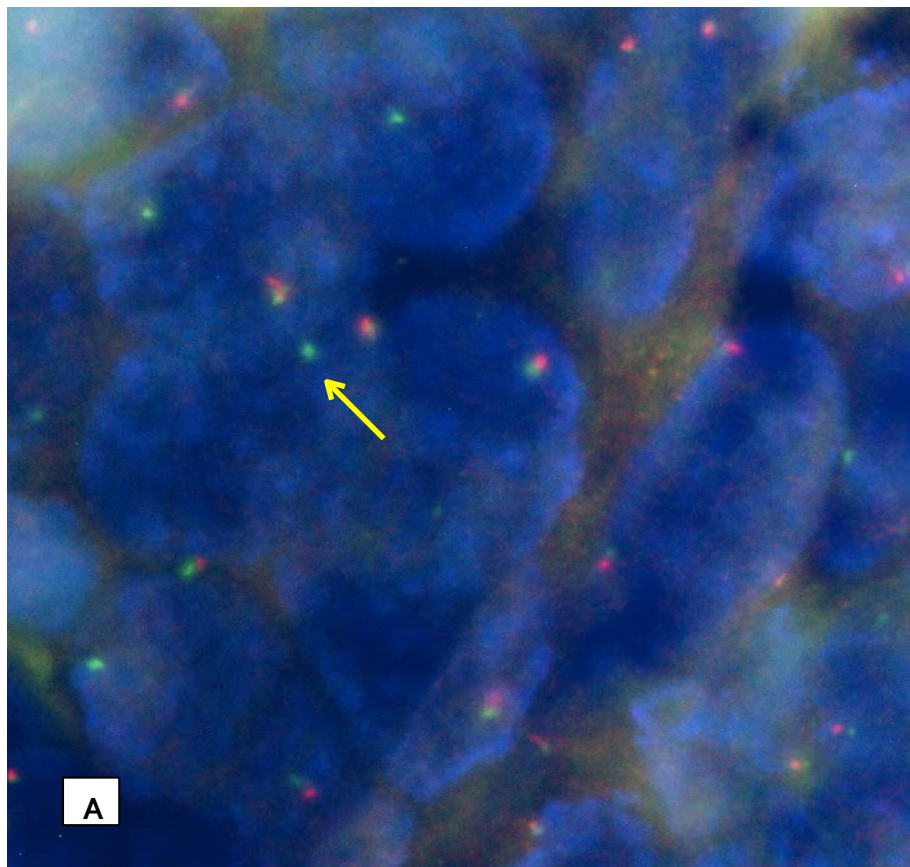
vyšetrovaný antigén	biopsia č.1	biopsia č 2.
CD20	pozit.	pozit.
CD10	negat.	negat.
bcl6	negat.	pozit.
bcl2	negat.	pozit.
MUM1	nevyšetrený	pozit.
Ki-67	> ako 90%	>ako 90%

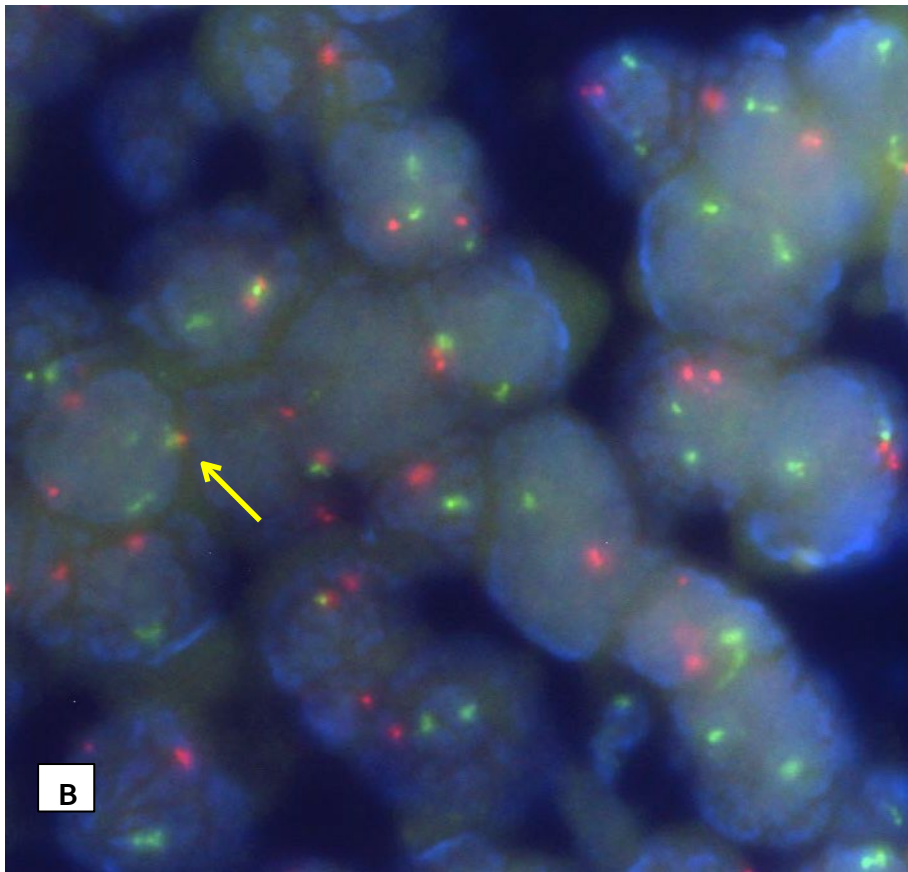
Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)

Biopsia č.1.

Realizovanými FISH vyšetreniami sme dokázali zlom v lokuse C-MYC (20%), prítomnosť IGH/C-MYC fúzie (18%) a 5' deléciu v lokuse BCL6 (89%). Lokus BCL2 bol bez prestavby (obr. 3., tab.2.).

Obr. 3. Biopsia č. 1 – fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH analýza): nádorové bunky vykazujú prítomnosť IGH/C-MYC fúzií (A) a 5' deléciu v lokuse BCL6 (B).

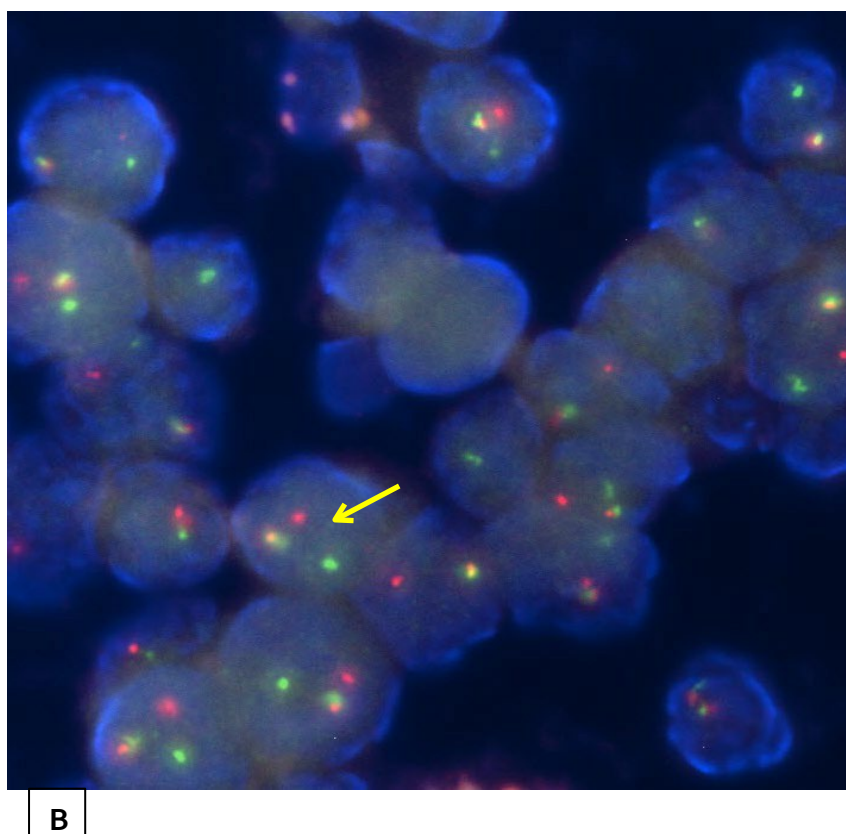
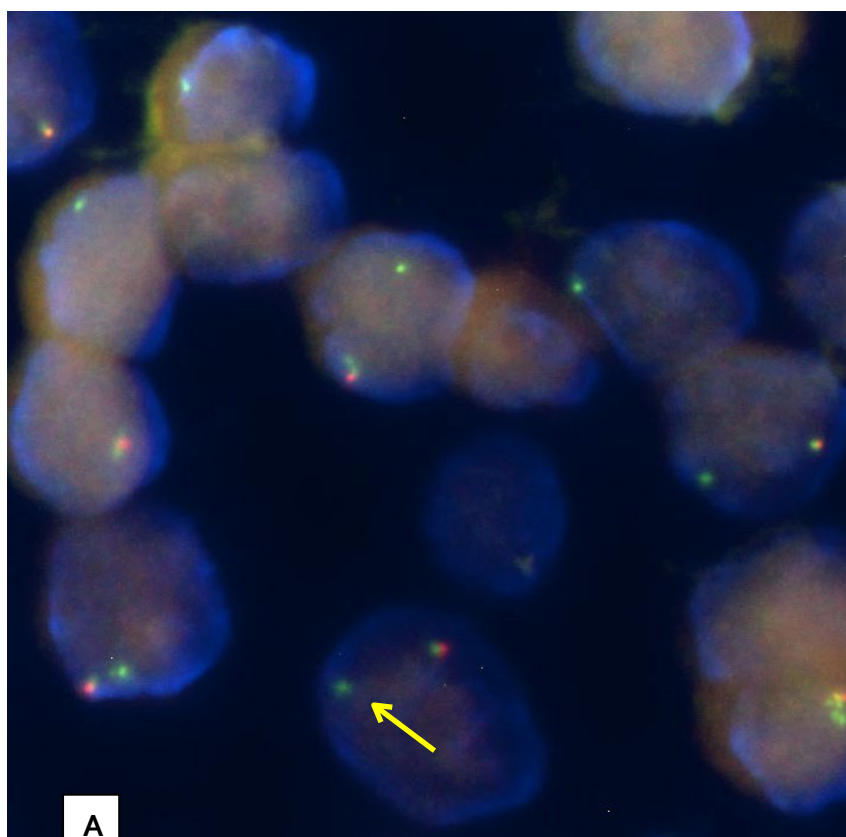




Biopsia č.2.

Realizovanými FISH vyšetreniami sme v tejto biopsii vylúčili prestavbu v lokuse BCL2, C-MYC a prítomnosť IGH/C-MYC fúzií. Bola dokázaná 5' delécia v lokuse BCL6 (70%) a zlom v lokuse IGH (56%) (obr. 4, tab. 2.).

Obr. 4. Biopsia č. 2 – fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH analýza): nádorové bunky vykazujú prítomnosť 5' delécie v lokuse BCL6 (A) a zlom v lokuse IGH (B).



Tab. 2. Porovnanie výsledkov FISH analýzy v biopsii č. 1. a č 2.

vyšetrovaný gén	zistená abnormalita	biopsia č.1	biopsia č 2.
BCL2		negat. (0%)	negat. (0%)
BCL6	5' delécia	pozit. (89%)	pozit (70%)
C-MYC	zlom	pozit. (20,5%)	negat. (0%)
IGH/C-MYC	fúzia	pozit. (18%)	negat. (0%)
IGH	zlom	pozit. (17%)	pozit.(56%)

Diskusia

K najčastejším genetickým zmenám v DLBCL patria chromozomálne translokácie génov BCL6 (19-36% prípadov), BCL2 (20-30% prípadov) a génov pre ťažký a ľahký reťazec Ig (Hartmanne et al., 2007). Hoci bola translokácia C-MYC génu dlho spojená iba s BL, zistilo sa, že sa vyskytuje aj u iných agresívnych B-bunkových lymfómov, vrátane DLBCL. Samotná C-MYC translokácia sa deteguje v 5-10% prípadoch DLBCL (Savage et al., 2009). Translokačnými partnermi C-MYC génu sú v 60% prípadoch IG gény a v 40% rôzne non-IG gény – najčastešie oblasť chromozómu 9p13, zriedkavejšie 1p36, 3p25, 3q27, 4p14, 5q13, 12p11, 13q31 (Johnson et al., 2009; Barrans et al. 2010; Savage et al. 2009). V 15-20% DLBCL sa deteguje chromozómový zlom postihujúci lokus C-MYC/8q24 v kombinácii s inou rekurentnou chromozómovou translokáciou, najčastejšie s translokáciou t(14;18)(q32;q21) zahŕňajúcou BCL2 gén (62% prípadov). Menej často (8% prípadov) je detegovaná konkurentná translokácia C-MYC a BCL6 génu (Aukema et al., 2011; Swerdlow et al., 2017). Táto podskupina DLBCL nazývaná ako „double hit“ DLBCL (DH DLBCL) sa v súčasnej SZO klasifikácii (2017) začleňuje do samostatnej nozologickej jednotky s názvom „Vysoko-malígne B-bunkové lymfómy s MYC a BCL2 a/alebo BCL6 preskupením“ (predtým zahrnuté pod tzv. „B-bunkové lymfómy, neklasifikovateľné, s intermediárnymi črtami medzi DLBCL a BL“- BCLU: „B-cell lymphoma, unclassifiable with features intermediate between DLBCL and BL“). DH DLBCL sú vysoko agresívne nádory charakteristické pokročilým klinickým štádiom ochorenia, vysokým intermediárnym až vysokým rizikom medzinárodného prognostického indexu a extranodálnym postihnutím vrátane infiltrácie KD a CNS (Aukema et al., 2011). Medián prežívania pacientov je menej ako 1 rok a 5-ročné celkové prežívanie je 20-30%. Veľkou výzvou v tejto podskupine DLBCL zostáva objavenie účinnej terapie. Vhodnou liečebnou metódou sa zdá byť kombinovaná vysokodávkovaná imunochemoterapia s uplatnením princípov liečby BL (napr. protokol GMALL) a autológna

transplantácia krvotvorných buniek (Friedberg et al. 2012; Sweetenham et al., 2012; Savage et al., 2009).

DH lymfómy majú pomerne heterogénny morfológický obraz, môžu mať vzhľad BL, DLBCL alebo zriedkavejšie FL. Väčšina DH C-MYC a BCL2 DLBCL vykazuje IHC „tripple“ pozitívnu expresiu CD10, bcl6 a bcl2 proteínov, pri zriedkavosti expresie MUM1 proteínu a proliferačnú aktivitu (index Ki-67) v rozsahu 50-100% (Aukema et al., 2011; Pillai et al., 2013). Podľa analýzy profilu génovej expresie patria zväčša do tzv. GCB podskupiny. Naproti tomu DH C-MYC a BCL6 DLBCL majú morfológiu skôr BL, sú zvyčajne negatívne pri dôkaze CD10 a bcl2 proteínu a častejšie vykazujú MUM1 pozitivitu (Pillai et al., 2013; Turakhia et al., 2014). V prípade DH C-MYC a BCL2 DLBCL, translokácia t(8;14)(q24;q32) vedie k overexpresii C-MYC proteínu a tým k rýchlej bunkovej proliferácii, translokácia t(14;18)(q32;q21) aktivuje overexpresiu bcl2 proteínu a inhibuje tak apoptózu. Preto možno konštatovať, že za zlú prognózu týchto nádorov zodpovedá najskôr spolupôsobenie týchto translokovaných génov (Johnson et al., 2009; Barrans et al., 2010; Savage et al., 2009).

DH C-MYC a BCL6 DLBCL sú cytogeneticky menej komplexné a ich patogenéza nie je ešte plne objasnená – traslokácia BCL6 génu pravdepodobne prispieva k zvýšenej proliferácii nádorových buniek (Pillai et al., 2013). V predloženej kazuistike sme reportovali prípad pacienta s primárne nodálnym DH DLBCL s extranodálnou propagáciou a neskorším relapsom do mozgu, ktorý imitoval PCNSL. V prvej biopsii z intraspínálneho TU nádorový infiltrát blastického vzhľadu vykazoval tzv. non-GCB DLBCL fenotyp s veľmi vysokou proliferačnou aktivitou (index Ki-67 viac ako 90%), ktorý pripúšťal diagnózu DLBCL miechy. Druhá biopsia z TU mozgu v oblasti BG ukázala identický histomorfologický obraz a podobný fenotyp, navyše s pribudnutím pozitívnej bcl2 a bcl6 proteínovej expresie. Nádor predstavoval relaps DLBCL v CNS a fenotypovo, typickou vysokou „tripple“ pozitívnou expresiou MUM1, bcl2 a bcl6 proteínov pri absencii expresie proteínu CD10, favorizoval PCNSL. Až retrospektívne získané klinické informácie o pacientovi ukázali, že ochorenie bolo už pri prvej biopsii diseminované (IV. klinické štádium), pacient dostával intenzívnu chemoterapiu a absolvoval autológnu transplantáciu krvotvorných buniek. Táto liečba viedla ku kompletnej remisii až do relapsu, pričom pacient mesiac po relapse exitoval. Biopsie boli retrospektívne analyzované metódami FISH. Prvá biopsia vykazovala zlom v lokuse C-MYC, 5' deléciu v lokuse BCL6 a prítomnosť IGH/C-MYC fúzií. V druhej biopsii bola detegovaná identická 5' delécia v lokuse BCL6 a zlom v lokuse IGH, pričom lokus C-MYC a BCL2 (aj napriek bcl2 pozitívnej expresii) bol bez prestavby. Lokus BCL6 vykazoval 5' deléciu v značnom množstve nádorových buniek v oboch biopsiách. Je problematické sa na základe FISH analýzy vyjadriť, či v oboch nádoroch skutočne došlo k translokácii časti BCL6 génu, s iným ako IGH partnerom alebo len k jeho 5' delécii. V biopsii č. 1. vznikol v lokuse C-MYC zlom v 20% nádorových buniek, čo korešponduje s prítomnosťou IGH/C-MYC fúzií, ktoré sa vyskytovali v 18% buniek a so zlomom v lokuse IGH (17% nádorových buniek). V biopsii č. 2. sa zlom v lokuse IGH

detegoval v 56% nádorových buniek. Naproti tomu v biopsii č. 1. bol zlom v lokuse IGH prítomný iba v 17% nádorových buniek, čo korešponduje so zlomom v lokuse C-MYC (20% nádorových buniek) a s prítomnosťou IGH/C-MYC fúzií (18% nádorových buniek). Navyše v biopsii č. 2 nebola prítomná translokácia $t(8;14)(q24;q32)$, takže predpokladáme, že klon buniek s touto translokáciou pravdepodobne vplyvom liečby vymizol, ale pribudol nový klon so zlomom v lokuse IGH, ktorý už nie je možné bližšie špecifikovať. V konečnom dôsledku prítomnosť translokácie $t(8;14)(q24;q32)$ a aberácie v lokuse BCL6 v biopsii č. 1. pripúšťa diagnózu DH DLBCL.

Záver

Vyšetrenie metódou FISH má dnes nezastupiteľnú úlohu v diagnostike DH DLBCL, ako podskupiny DLBCL asociovanej s extranodálnym postihnutím, vysokým rizikom relapsu v CNS a rezistenciou k štandardnej chemoterapii. Preto sa odporúča realizovať túto analýzu pri diagnostike všetkých DLBCL, alebo aspoň v tých prípadoch, v ktorých sa prekrývajú morfológické a fenotypové charakteristiky DLBCL a BL. V prezentovanom prípade sme chceli poukázať na komplexnosť biopctickej a FISH analýzy pri diagnostike agresívnych lymfómov, ktorú je potrebné doplniť aj adekvátnymi klinickými údajmi. Nádor pôvodne hodnotený ako PCNSL predstavoval diseminovaný DH DLBCL s postihnutím CNS, ktorý bol aj napriek intenzívnej terapii a transplantácii KD asociovaný s veľmi zlou prognózou. Finálna diagnóza teda predstavuje „puzzle“ všetkých dostupných údajov.

Použitá literatúra

- Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with $t(14;18)$ and $8q24/c-MYC$ rearrangement. *Haematologica*. 2007;92:1335-1342.
- Niitsu N, Okamoto M, Miura I, et al. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with $t(14;18)$ and $8q24/c-MYC$ translocations. *Leukemia*. 2009;23:777-783.
- Damek DM et al. Primary central nervous system lymphoma. *Curr Treat Options neurol*. 2003;5: 213-22.
- Ferreri AJ, Reni M. et al. Primary central nervous system lymphoma. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007;63: 257-268.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2017; In IARC Press, Lyon. ISBN 978-92-832-4494-3, 585.
- Camilleri-Broet S, Criniera E, Broet P. et al. A uniform activated B-cell like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*. 2006;107: 190-198.

Hans CHP et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. In *Blood*. 1 January. 2004;103 (1): 275-282.

Hartmanne M, Ott G, Rosenwald A. et al. Molecular Biology and Genetics of Lymphomas. In *Oncology stat*. 2007, 807-823 s.

Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114 (11):2273-9.

Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3360-5.

Friedberg JW (2012) Double-hit diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 30:3439–3443.

Sweetenham et al. How to treat patients with borderline DLBCL and Burkitt's lymphoma *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2012;6:205-212

Savage KJ, Johnson NA, Ben Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114(17):3533-7.

Iqbal J, Neppalli VT, Wright G et al. BCL2 Expression Is a Prognostic Marker for the Activated B-Cell-Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(6): 961–968.

Lin P, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma/ leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis. *Haematologica*. 2007;92(10):1297-1301.

Aukema S.M., Kreuz M., Kohler C. W. et al. "Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma," *Haematologica*, vol. 99, no. 4, pp. 726–735, 2014.

Aukema S.M. et al., "Double-hit B-cell lymphomas," *Blood*, vol. 117, no. 8, pp. 2319–2331, 2011.

Pillai R.K., Sathanoori M., van Oss S.B., Swerdlow S.H. "Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas," *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 37, no. 3, pp. 323–332, 2013.

Turakhia S.K., Hill B.T., Dufresne S.D. et al. "Aggressive B-cell lymphomas with translocations involving BCL6 and MYC have distinct clinical-pathologic characteristics," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 142, no. 3, pp. 339–346, 2014.

Riziko karcinómu hrubého čreva vo vzťahu k SNP CYP2W1 a

Matáková T.¹, Babušíková E.¹, Škereňová M.².

¹ Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

² Biomed, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

CYP2W1 je onkošpecifický cytochróm P₄₅₀, monooxygenáza ktorá katalyzuje mnohé reakcie zapojené do metabolizmu liečiv, karcinogénov a prokarcinogénov a syntézy cholesterolu, steroidov a iných lipidov a teda zohráva dôležitú úlohu v progresii kolorektálneho karcinómu, pravdepodobne prostredníctvom metabolizmu týchto látok. Gén CYP2W1 sa vyznačuje špecifickou expresiou v nádorových bunkách a len minimálnou expresiou v normálnych tkanivách dospelého človeka. Jeho expresia je vyššia v pokročilých štádiách. Cieľom práce bolo zistiť aký vplyv v tomto géne má SNP rs3735684 na riziko vzniku karcinómu hrubého čreva. Zistili sme že prítomnosť mutovanej alely (Thr) v genotype má tendenčný protektívny efekt - OR=0,88. Tento efekt sa výraznejšie potvrdil aj v asociačnom teste v dominantnom aj aditívnom modeli u mužov kde OR= 0,24. Tento fakt naznačuje, že sledovaný SNP znižuje karcinogénny potenciál enzýmu, čím robí CYP2W1 zaujímavým potenciálnym prognostickým biomarkerom a terapeutickým cieľom v onkológii.

Kľúčové slová: karcinóm čreva, SNPs CYP2W1, náchylnosť

Úvod

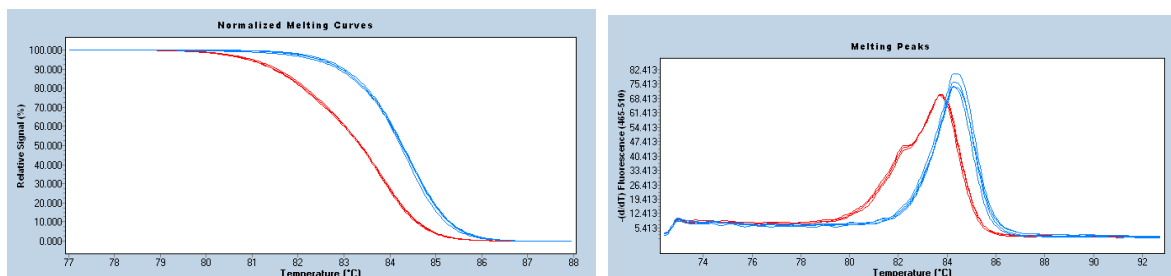
CYP2W1 je onkofetálny enzým – jeho expresia je vysoká v fetálnych tkanivách, ale v dospelom tele sa vyskytuje takmer výlučne v nádoroch, najmä v kolorektálnom karcinóme (CRC). Vysoká expresia CYP2W1 bola zaznamenaná v pokročilých štádiách CRC, pričom bola spojená s horšou prognózou a vyšším rizikom metastáz. Tento enzým sa skúma ako potenciálny terapeutický cieľ, pretože je schopný aktivovať proliečivá špecificky v nádorových bunkách. Aj keď je CYP2W1 menej preskúmaný ako iné enzýmy P₄₅₀, štúdie naznačujú jeho úlohu v metabolizme lipidov. CYP2W1 môže oxidovať mastné kyseliny a ich deriváty na bioaktívne molekuly, ktoré regulujú proliferáciu buniek, zápal a angiogézu. Jeho aktivita môže ovplyvniť syntézu eikosanoidov, čo by mohlo podporovať progresiu CRC. Existujú dôkazy, že CYP2W1 môže metabolizovať sekundárne žľčové kyseliny, ako je deoxycholová kyselina (DCA) a lithocholová kyselina (LCA), ktoré sú známe svojimi karcinogénnymi účinkami v hrubom čreve. Ak CYP2W1 premieňa tieto žľčové kyseliny na reaktívne intermediáty, môže to zvyšovať genotoxické poškodenie a riziko CRC.

Špecifické genetické varianty CYP2W1*2 môžu ovplyvniť aktivitu enzýmu a jeho schopnosť metabolizovať karcinogény. Niektoré polymorfizmy v CYP2W1 sú spojené s vyššou enzymatickou aktivitou, čo môže zvyšovať tvorbu reaktívnych metabolitov a DNA poškodenie v hrubom čreve. Naopak, niektoré varianty môžu znižovať aktivitu CYP2W1, čím by sa mohol znižovať karcinogénny potenciál enzýmu. CYP2W1 sa preto skúma ako genetický biomarker CRC, ktorý by mohol pomôcť v predikcii rizika a odpovede na liečbu.

Materiál a metódy

Do súboru prípadov (pacientov) bolo zaradených 226 pacientov s histopatologicky verifikovaným kolorektálnym karcinómom (diagnózy C18, C19), s akýmkoľvek cT a cN, ktorí boli hospitalizovaní a liečení na Chirurgickej klinike Univerzitnej nemocnice v Martine v období od roku 2009 – 2019. Vzorky periférnej krvi zdravých kontrol v počte 417 boli získané od dobrovoľných darcov plnej krvi z Transfúzneho oddelenia Univerzitnej nemocnice v Martine; od zdravých dobrovoľníkov vyšetovaných v rámci preventívnych prehliadok na Klinike pracovného lekárstva Univerzitnej nemocnice v Martine; a zamestnancov Jesseniovej lekárskej fakulty UK v Martine. Priemerný vek pacientov (prípadov) v čase odberu periférnej krvi na DNA vyšetrenie bol $65,6 \pm 11,2$ (medián 66) rokov. Priemerný vek v kontrolnej skupine bol $53,9 \pm 11,9$ (medián 54) rokov.

Pre enzymatický systém cytochrómu P450 sme sledovali SNP CYP2W1*2 (rs3735684), ktorý sme zvolili na základe jeho charakteristiky v databázach GeneSNPs, HGMD a dbSNP. Jednonukleotidový polymorfizmus rs985219 sa nachádza na chromozóme 7 v pozícii 985219. a predstavuje zámenu báz adenínu (A) za guanín (G) v pozícii 373 v rámci génu CYP2W1. Táto zmena vedie k zámene aminokyseliny v proteíne, konkrétne alanínu za treonín, ktorá predstavuje substitúciu nepolárnej aminokyseliny za polárnu, čo by mohlo ovplyvniť štruktúru alebo funkciu proteínu. Na identifikáciu SNP sme použili metódu HRM. Sekvencia primerov bola nasledovná: F: GGCTCCCTCCAATATCACCT a R: GGGTCCCGGTAGTCAAATC; dĺžka amplicónu bola 60bp; teplota topenia 56°C . Obr.1



(a)

(b)

Obrázok 1 Grafické znázornenie priebehu HRMA pre rs3735684 génu CYP2W1*2 v programe LightCycler® 480 Gene Scanning Software v1.5.

- (a) normalizované krivky topenia vzoriek DNA, zoskupené podľa genotypu do dvoch skupín: červená – vzorky s genotypom G/A a modrá – vzorky s genotypom G/G;
- (b) teplotné maximá (píky) pre jednotlivé genotypy. Genotyp A/A nebol detegovaný.

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov a testovanie hypotéz bol použitý program STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Na testovanie odchýlok vo veku medzi kontrolnou a patientskou skupinou bol použitý neparametrický Mann-Whitney test. Genetické analýzy boli uskutočnené v programe SVS v8.3 (SNP & Variation Suite, Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Na testovanie významnosti odchýlky od Hardy-Weinbergovej rovnováhy a na testovanie základných alelových asociácií bol použitý Fisherov test. Asociačné testy boli uskutočnené metódou adjustovanej logistickej regresie s „case-control“ statusom ako závislou premennou, vekom a pohlavím ako mäťúcimi premennými, vo všetkých troch genetických modeloch (dominantný, aditívny a recesívny). Konečný výber vysvetľujúcich premenných v modeli bol vykonaný pomocou postupnej (stepwise) regresie. Na stanovenie genetického rizika sme použili charakteristiku pomer šancí – odds ratio (OR) s 95 % intervalom spoľahlivosti. Za štatisticky významné boli považované hodnoty pravdepodobnosti testov pod hladinou významnosti alfa 0,05.

Výsledky

Výsledky frekvencií minoritných alel (MAF) sledovaného SNP v slovenskej populácii boli porovnané s priemernými frekvenciami alel v populáciách zastúpených v databáze 1000 Genomes, s cieľom p s údajmi pre európsku/kaukazskú populáciu. Frekvencie alel v sledovaných súboroch slovenskej populácie sú uvedené v tab.2.

Tabuľka 2 Frekvencie menšinových alel SNP a výsledky testovania asociácie náchylnosti na karcinóm čreva

Gén	Marker	Alela ^a	Prípad	Kontrola	P ^b	OR	CI (95 %)
CYP2W1*2	rs3735684	Thr	0,06	0,07	0,73	0,88	0,44-1,74

Pozn.: ^a – menšinová alela; alely sú označené nukleotidovými skratkami (malé písmená) alebo skratkou aminokyseliny, ktorej alela zodpovedá; ^b - Fisherov presný test.

V tabuľke 3 sú uvedené frekvencie genotypov v sledovaných skupinách. Genotyp DD, teda kombinácia dvoch minoritných alel nebol nájdený u žiadneho jedinca tak v skupine kontrol ako v skupine prípadov.

Tabuľka 3 Výskyt genotypov SNPs v skupinách prípadov a kontrol.

Frekvencia genotypov (%)							
		Prípad			Kontrola		
Gén	Marker	DD	Dd	dd	DD	Dd	dd
CYP2W1*2	rs3735684	0,00	0,12	0,88	0,00	0,13	0,87

Pozn.: D – menšinová alela, d – väčšinová alela.

Ďalej sme sledovali asociačné testy na troch modeloch. Vzhľadom k tomu, že nebol v súbore ani raz nájdený genotyp DD, recesívny model z hodnotenia vypadol. Výsledky testov sú uvedené v tab.

4. Výsledky pre dominantný aj aditívny model boli zhodné, čo ukazuje, že prítomnosť menšinovej alely má vplyv na efekt genotypu. Kým v skupine pacientov mužov mala prítomnosť menšinovej alely v genotype protektívny efekt, v skupine žien, naopak rizikový efekt.

Tabuľka 4 Výsledky asociačných testov genotypov bez a s ohľadom ohľadu na pohlavie a lokalizáciu (C18+C19)

		Dominantný model			Aditívny model			Recesívny model		
Gén		P ^a	OR	CI (95 %)	P ^a	OR	CI (95 %)	P ^a	OR	CI (95 %)
CYP2W1*2	všetci	0,91	1,05	0,42-2,58	0,91	1,05	0,42-2,58	*	*	*
CYP2W1*2	ženy	0,13	2,53	0,75-8,48	0,13	2,53	0,75-8,48	*	*	*
CYP2W1*2	muži	0,09	0,24	0,04-1,37	0,09	0,24	0,04-1,37	*	*	*

Pozn.: ^a – P adjustované na vek a pohlavie regresnou analýzou;

*- aspoň jeden z možných genotypov, v súbore prípadov alebo kontrol, nebol nájdený (n = 0).

Diskusia

CYP2W1 je monooxygenázový enzým patriaci do superrodiny cytochrómov P₄₅₀, ktorý sa zúčastňuje metabolizmu rôznych endogénnych substrátov vrátane lyzofosfolipidov, kyseliny arachidonovej, benzfetamínu a indolu, ako aj aktivovať niekoľko prokarcinogénov, vrátane polycyklických aromatických uhľovodíkov, aflatoxínu B₁ a sterigmatocystínu. (Karlgrén a Ingelman-Sundberg, 2007; Xiao a Guengerich, 2013). Okrem toho CYP2W1 konvertuje kyselinu all-trans-retinovú (atRA) na 4-hydroxyatRA a all-trans-retinol na 4-hydroxyall-trans-retinol, čo naznačuje jeho úlohu v metabolizme retinoidov (Zhao, 2016).

Súčasne je zapojený do syntézy cholesterolu, steroidov a iných lipidov. CYP2W1 je exprimovaný najmä v nádorových tkanivách a počas fetálneho vývoja. Počas vývoja gastrointestinálneho traktu je CYP2W1 exprimovaný, avšak po narodení je jeho expresia v čreve a hrubom čreve umlčaná epigenetickými modifikáciami. Pri kolorektálnom karcinóme dochádza k reaktivácii CYP2W1 v dôsledku demetylácie. Úrovně expresie u CRC pozitívne korelujú so stupňom malignity, sú vyššie v metastázach a sú prediktívne pre prežívanie pacientov (Guo et al., 2016).

V štúdií z roku 2014 bola overexpresia CYP2W1 spojená s hepatocelulárnym karcinómom (HCC), pričom vyššia expresia bola spojená s horšou prognózou (Zhang et al. 2014). CYP2W1 je tiež exprimovaný v normálnych a neoplastických nadobličkách, čo naznačuje jeho potenciál ako cieľa pre ciele terapiu pri adrenokortikálnom karcinóme (ACC). Navyše, vysoká expresia CYP2W1 bola spojená s lepšou odpoveďou na liečbu mitotanom u pacientov s ACC (Ronchi et al., 2014). V štúdií z roku 2022 bola nízka expresia CYP2W1 spojená s horším prežívaním pacientiek s karcinómom prsníka, čo naznačuje jeho potenciál ako prognostického biomarkera (Aiyappa-Maudsley et al., 2022). CYP2W1 má schopnosť aktivovať niektoré liečivá na cytotoxické látky, čo naznačuje jeho potenciál ako cieľa pre ciele protinádorovú terapiu. Napríklad, CYP2W1 môže konvertovať syntetické deriváty duokarmycínu na aktívne protinádorové látky, čo bolo preukázané v štúdiách na myších modeloch (Travica et al., 2013).

Vzhľadom na tieto fakty, expresia génu CYP2W1 je považovaná za zaujímavý nezávislý diagnostický a prognostický marker (Karlgrén a kol., 2006; Gomez a kol., 2007; Edler a kol., 2009; Gomez a kol., 2010; Chung a kol., 2016). Štúdií sledujúcich asociáciu polymorfizmov s náchylnosťou na CRC je pomerne málo. Na kaukazskej populácii bolo zistená asociácia SNP rs3735684 génu CYP2W1 so zvýšeným rizikom CRC (Gervasini a kol., 2010), čo neskôr vyvrátila štúdia na švédskej populácii, ktorá efekt tohto SNP nepotvrdila (Stenstedt a kol., 2013). My sme v našej štúdií na slovenskej populácii zistili potenciálny protektívny efekt polymorfizmu predovšetkým v skupine mužov. Naopak v skupine žien sme zistili potenciálne rizikový efekt. Keďže štúdií je veľmi málo, je potrebné doplniť sledovania o závislosti nielen na pohlaví, ale aj presnej lokalizácii nádoru ako aj štádia nádorového ochorenia. To by mohlo výraznejšie upresniť efekt polymorfizmov tohto génu na nielen na riziko rozvoja ochorenia ale aj na prognózu vývoja ochorenia.

Celkovo je CYP2W1 zaujímavým cieľom pre ďalší výskum zameraný na jeho úlohu v nádorovej biológii a potenciálne terapeutické aplikácie.

Použitá literatura

- Aiyappa-Maudsley R, Storr SJ, et al. CYP2S1 and CYP2W1 expression is associated with patient survival in breast cancer. *J Pathol Clin Res*. 2022 Nov;8(6):550-566.
- Edler D, Stenstedt K, Ohrling K, et al. The expression of the novel CYP2W1 enzyme is an independent prognostic factor in colorectal cancer - a pilot study. *Eur J Cancer*. 2009 Mar;45(4):705-12.
- Gomez A, Nekvindova J, Travica S, et al. Colorectal cancer-specific cytochrome P450 2W1: intracellular localization, glycosylation, and catalytic activity. *Mol Pharmacol*. 2010 Dec;78(6):1004-11.
- Gomez A, Karlgren M, Edler D, et al. Expression of CYP2W1 in colon tumors: regulation by gene methylation. *Pharmacogenomics*. 2007 Oct;8(10):1315-25.
- Guo J, Johansson I, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. The CYP2W1 enzyme: regulation, properties and activation of prodrugs. *Drug Metab Rev*. 2016 Aug;48(3):369-78.
- Chung FF, Mai CW, Ng PY, Leong CO. Cytochrome P450 2W1 (CYP2W1) in Colorectal Cancers. *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(1):71-8.
- Karlgren M, Ingelman-Sundberg M. Tumour-specific expression of CYP2W1: its potential as a drug target in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Jan;11(1):61-7.
- Ronchi CL, Sbiera S, Volante M, et al. CYP2W1 is highly expressed in adrenal glands and is positively associated with the response to mitotane in adrenocortical carcinoma. *PLoS One*. 2014 Aug 21;9(8):e105855.
- Travica S, Pors K, Loadman PM, et al. Colon cancer-specific cytochrome P450 2W1 converts duocarmycin analogues into potent tumor cytotoxins. *Clin Cancer Res*. 2013 Jun 1;19(11):2952-61.
- Zhang K, Jiang L, He R, et al. Prognostic value of CYP2W1 expression in patients with human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2014 Aug;35(8):7669-73.
- Zhao Y, Wan D, Yang J et al. Catalytic Activities of Tumor-Specific Human Cytochrome P450 CYP2W1 Toward Endogenous Substrates. *Drug Metab Dispos*. 2016 May;44(5):771-80.

Rozsiahle poškodenie pečene parazitom *Echinococcus granularis* riešené chirurgicky (Kazuistika)

Laca L., Miklušica J., Mikolajčík P.

Klinika všeobecnej, viscerálnej a transplantáčnej chirurgie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Parazitárne cysty pečene sú v našich podmienkach spôsobené najčastejšie infekciou *Echinococcus granulosus*, ktoré tvoria asi 80 % a *echinococcus alveolaris* s podielom zvyšných 20% infekcií. Väčšina echinokokových cyst je na začiatku asymptomatických a až po dosiahnutí určitej veľkosti sa objavujú symptómy z útlaku štruktúr. Diagnóza je potvrdená ultrasonografiou, CT vyšetrením a serologickými testami.

V prezentácii popisujeme prípad 54-ročnej pacientky s veľkou echinokokovou cystou a dcérskymi cystami v pravom laloku pečene s infiltráciou pravej nadobličky a útlakom vena cava inferior (VCI). Klinicky sa prejavila tlakom pod pravým rebrovým oblúkom, narastaním objemu brucha a opuchom oboch dolných končatín. Po diagnostike bola vykonaná radikálna pravostranná hepatektómia, exstirpácia pravej nadobličky a odpreparovanie steny cysty od steny VCI. Následne aplikovaná liečba Albendazolom v trvaní 2 rokov po operácii. Po operácii pacientke ustúpili tlakové symptómy aj edémy dolných končatín a je doteraz asymptomatická.

Metódou voľby v terapii veľkých hydatidových cyst je radikálna chirurgická resekcia s následnou medikamentóznou liečbou albendazolom.

Kľúčové slová: Veľká Echinokoková cysta, kompresia VCI, radikálna resekcia pečene

Úvod

Cystická Echinokokóza je parazitická zoonóza, rozšírená po celom svete. Je spôsobená larválnymi štádiami echinokoka. Okrem *Echinococcus granularis* (EG) ochorenie spôsobuje aj *E. multilocularis* (alveolaris) a desiatka ďalších, ktoré sú však menej rozšírené a vyskytujú sa len v určitých endemických oblastiach. Koneční hostitelia sú psy a psovité šelmy, v našich krajinách je to pes a líška. Medzihostiteľom je najčastejšie ovca. Ľudia sa infikujú fekáliami psovitého šelmy, ktoré majú v tenkom čreve dospelého EG, ktorý vylučuje do exkrementov vajíčka s embryami. Tieto sa cez tráviaci trakt človeka dostávajú do rozličných orgánov, najčastejšie pečene a pľúc a tu vytvárajú hydatidové cysty (Lendoire JC. et al., 2023)

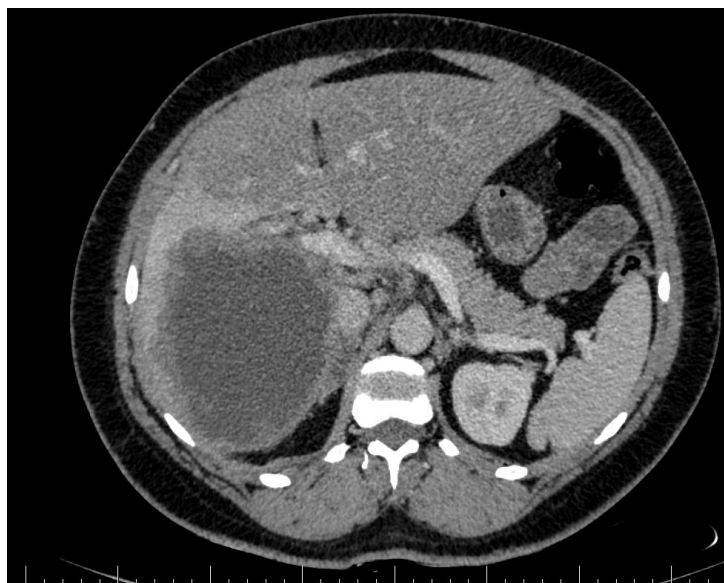
Incidencia EG je celosvetovo 2-200 / 100 000 obyvateľov, v Európe sa pohybuje 4-8/ 100 000 obyvateľov. Na Slovensku v roku 2017 proti 2016 bola zistená klesajúca incidencia EG, čo súvisí

pravdepodobne s poklesom chovu oviec. V Rakúsku, Nemecku a Poľsku bola naopak zaznamenaná zvýšená incidencia (Deplazes, P. et al.).

Kazuistika

54-ročná pacientka bola v máji 2016 vyšetrená na cievnej ambulancii UNM pre edémy dolných končatín. Pri sonografickom vyšetrení zistený útlak VCI cystickým útvarom pečene priemeru 13 cm a viacerými cystami v okolí do priemeru 2 cm. Nález bol uzavretý ako obrovská cysta pečene s ďalšími dcérskymi cystami, najpravdepodobnejšie parazitárneho pôvodu. Bola odoslaná na infektologické vyšetrenie a na chirurgickú kliniku UNM. Na infekčnej klinike bola serologicky potvrdená pozitivita na parazita EG, nasadený albendazol a odtiaľ bola odoslaná k nám na chirurgickú kliniku.

Pri prijatí sa pacientka sťažuje na dyskomfort v oblasti pravého hypochondria, nohy ju nebolia, mierne opúchajú k večeru. klinicky je pacientka obézna, brucho je ťažko priehmatné, avšak bez evidentnej bolestivosti. Má jazvy po laparoskopike j cholecystektómii. CT brucha s 3-fázovým kontrastom potvrdilo parazitárnu cystu pečene priemeru 13 cm s dcérskymi cystami do veľkosti 2 cm v okolí materskej cysty, odtlačenie pravej obličky distálne, zavzatie pravej nadobličky do steny cysty a naliehanie a kompresiu VCI v retrohepatálnej časti(obr.1.)



Obr. 1. CT sken pacientky pred operačným riešením cysty. Materská cysta rozmerov 13x10x10cm v pravom laloku pečene a v okolí dcérske cysty. Zavzatie pravej nadobličky do steny cysty a odtlačenie pravej obličky distálne. Amputácia pravého hepatiku asi 2 cm za junkciou. Kompresia VCI a jej parciálne zavzatie do vonkajšej steny cysty. Vlastný materiál.

Po predoperačnej príprave dňa 9.8. 2016 vykonaná operácia v celkovej anestéze otvoreným prístupom: pravostranná hepatektómia (Segmenty 5-8), čiastočná resekcia segmentu S1,

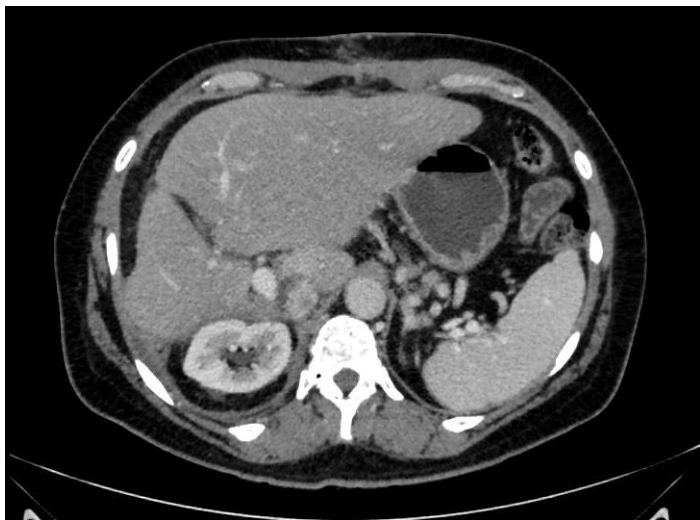
pravostranná epinefrektómia a odpreparovanie steny cysty od VCI. Postup : horná stredná laparotomia s rozšírením v dolnej časti rezu doprava, uvoľnenie pravej časti pečene s cystou zo zrástov s bránicou, vypreparovanie pravej hepatálnej vény a jej prerušenie cievny endostaplerom 45 mm. Obídenie ligamentum hepatoduodenale turniketom s jeho zatahnutím na 2x 18 min a resekcia pečeneového parenchýmu v Rex-Cantiego línii harmonickým skalpelom a Kellyho technikou. Pretože je stena cysty pevne fixovaná k nadobličke a k VCI, odsatie jej obsahu so sutúrou steny cysty. Cystu oddelíme od VCI harmonickým skalpelom, koaguláciou a nožnicami a vyberáme ju spolu s nadobličkou, ktorá je zavzatá do jej steny. Počas celej operácie sme požívali izolačné rúšky napustené betadinom, aby nedošlo k vyliatiu obsahu cysty do brušnej dutiny a disseminácii parazita. Odhadované krvné straty boli do 500 ml., hradené kryštaloïdmi a plazmou. Počas celého výkonu bola pacientka obehovo stabilná. V pooperačnom priebehu sa nevyskytli žiadne závažné komplikácie až na drobnú povrchovú infekciu operačnej rany, zhojenej v priebehu 14 dní (Obr.2.a,b.).



Obr. 2a,b. Resekát pečene S5-8,S1parcialis, na 2a vidieť tmavšie sfarbenú plochu po uvoľnení cysty z pravého crus bránice a na 2b vidíme rozrezanú cystu s hrboľatou výstelkou a exstirpovanou nadobličkou. Vlastný materiál.

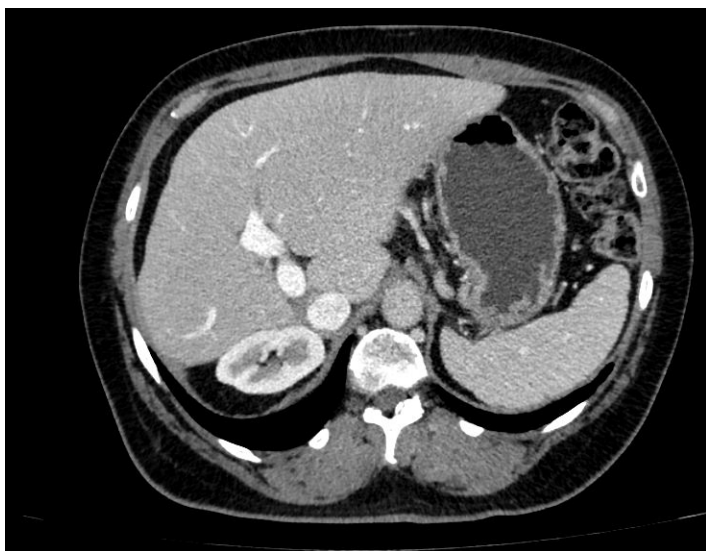
Histologický nález resekátu potvrdil hydatidovú cystu s hrubou hrboľatou výstelkou, pokrytou nekrotickými hmotami s kalcifikátmi a lamelami homogénneho eozinofilného PAS materiálu, zodpovedajúceho stenám parazitických cyst. Záver – ide o echinokokovú cystu echinokokus granulosis.

Pacientka bola po 10 dňoch prepustená do ambulantnej starostlivosti v dobrom celkovom stave. Kontroly mala ešte 14 dní po prepustení z dôvodu ošetrovania operačnej rany, potom ďalšia kontrola po 1 mesiaci s kontrolným CT vyšetrením 8.9.2016 (obr.3.).



Obr.3. CT scan jeden mesiac po pravostrannej resekcii pečene S5-8 s parciálnou resekciou S1 a resekciou pravej nadobličky. Prítomá je už hypertrofia S 1-4. Vlastný materiál.

Na kontrolnom CT vyšetrení vidieť už po mesiaci hypertrofiu zvyškového zdravého parenchýmu pečene, bez progresie a recidívy ochorenia. Pacientka bola pravidelne kontrolovaná v 6-mesačných a neskôr ročných intervaloch, posledná kontrola v novembri 2024 bez objavenia sa recidívy ochorenia. Bola vyradená s dispenzárnej starostlivosti(obr.4.).



Obr.4. CT kontrola 7.11.24. Veľkosť zvyšku pečene ako pred resekciou, bez recidívy ochorenia. Vlastný materiál.

Diskusia

Stena Echinokokovej cysty sa skladá z 3 vrstiev. Vonkajšiu vrstvu tvorí pericystické tkanivo, čo je vlastne reaktívne tkanivo hostiteľského organizmu na cudzí materiál cysty, stredná fibrózna vrstva a vnútorná germinatívna vrstva patria k parazitárnej cyste (Tesemma A et al.). Toto môžeme využiť pri chirurgickej extirpácii v hraničných prípadoch, ak stena cysty veľmi tesne nalieha na dôležité štruktúry pečene a musíme ponechať pericystickú vrstvu. V našom prípade to nebolo potrebné, podarilo sa oddeliť aj pericystickú vrstvu od steny VCI.

Z komplikácií veľkých hydatidových cýst treba spomenúť hlavne kompresiu retrohepatálnej časti VCI, čo spôsobuje edémy dolných končatín (Mohammed AA. et al, 2019). V našej kazuistike bola kompresia VCI prvým príznakom, ktorý sa prejavil edémom dolných končatín. Veľmi často sa stretávame s dcérskymi cystami a kalcifikátmi v stene cysty, ktoré sa vyskytli aj v našom prípade. O prítomnosť kalcifikácií sa opiera aj sonografická Ghargiho klasifikácia echinokokových cýst, podľa ktorej je navrhnutá aj najoptimálnejšia terapia (Kalinova K, 2007).

Chirurgický prístup môže byť otvorený alebo laparoskopický. Použitie miniinvazívnych techník je v súčasnosti na vzostupe, u nekomplikovaných cýst je rovnako bezpečný ako pri klasickej otvorenej technike. Pri komplikovaných echinokokových cystách stále zostáva otvorený prístup metódou voľby, ako bolo aj v našom prípade (Mihetiu, A. et al., 2024, Sotomayor C. et al, 2024).

Medikamentózna liečba má význam pri prevencii rekurencie po chirurgickom výkone a pri cystách, kde nie je možná radikálna chirurgická liečba, alebo sa dá vykonať len chirurgická paliácia (Ettorre GM. Et al., 2012, Qin-Dong J. et al., 2024)

Záver

Kompletná resekcia echinokokovej cysty s pooperačným podávaním antihelmintík (albendazol, mebendazol, benzimidazol) je v súčasnosti jediná liečebná metóda, ktorá vedie k vyliečeniu pacienta s týmto závažným ochorením. Toto potvrdzuje aj naša kazuistika, kde takáto liečba napriek pokročilosti ochorenia viedla k definitívnemu vyliečeniu pacienta a eliminácii parazita. U mnohých pacientov však takáto radikálna liečba nie je možná a musia byť využité len konzervatívne postupy ako medikamentózna liečba alebo kombinácia chirurgickej paliatívnej terapie s medikamentóznou liečbou. Preto treba zdôrazňovať potrebu zlepšenia diagnostiky echinokokózy a koncentrovať pacientov do centier, kde je možné vykonávať komplexnú starostlivosť.

Použitá literatura

- Deplazes P., Rinaldix L., Alvarez RCA. et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis. *Adv Parasitol.* 2017; 95:315-493.
- Ettorre GM, Vennarecci G, Santoro R, Laurenzi A, Ceribelli C, Di Cintio A, Rizzi EB, Antonini M. Giant hydatid cyst of the liver with a retroperitoneal growth: a case report. *J Med Case Rep.* 2012;6:298
- Kalinova K. Imaging(ultrasonography, computed tomography) of patients with hydatid liver disease. *Bulgarian J Vet Med.* 2007;10(1):45–51.
- Lendoire JC., Melloul EM., Imventarza OC. Hydatid Disease of the liver. In Jarnagin A. Blumgarts surgery of the liver, biliary tract, and pancreas. Elsevier. 2023, 1980 s.
- Mihetiu, A., Bratu, D., Neamtu, B. et al. Therapeutic Options in Hydatid Hepatic Cyst Surgery: A Retrospective Analysis of Three Surgical Approaches. *Diagnostics* 2024;14: 1399.
- Mohammed AA, Arif SH. Surgical excision of giant pedunculated hydatid cyst of the liver. *J Surg Case Rep.* 2019; 7:1-4
- Qin-Dong J, Lin-Xun L., Hai-Ning F. current status of drug therapy for alveolar echinococcosis. *World J Hepatol.* 2024 November27; 16(11): 1243-1254
- Sotomayor C, Reyes N, Briceño E, et al Radical Laparoscopic Pericystectomy of a Giant Hepatic Hydatid Cyst. *Cureus.* 2024 October 17; 16(10): e71674
- Tesemma A.,Adane M.,Bekele K. et al. Giant pedunculated liver hydatid cyst causing inferior vena cava syndrome: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2024, 18:464
- immune system, and cancer. *Frontiers in Immunology*, 3, 2012 283.

Úroveň vedomostí rodičov o pohybovom vývine dieťaťa do jedného roka

Zanovitová M., Lepiešová M., Bieláková M.

Ústav ošetrovateľstva, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Cieľom štúdie bolo zistiť vedomosti rodičov o správnej manipulácii s dieťaťom a podpore pohybového vývinu dieťaťa do jedného roka života, ako aj identifikovať prípadný deficit v tejto oblasti. Na zber empirických údajov bol použitý dotazník vlastnej konštrukcie, ktorý bol zostavený na základe štúdia odbornej literatúry. Dotazník obsahoval 37 otázok rozdelených do dvoch častí: vedomosti rodičov o pohybovom vývine a demografické údaje. Zber údajov prebiehal od decembra 2023 do marca 2024. Na vyhodnotenie údajov bola použitá jednorozmerná deskriptívna štatistika. Z celkového počtu distribuovaných dotazníkov (140) bolo analyzovaných 102 platných dotazníkov. Analýza odpovedí ukázala, že 78 respondentov preukázalo dostatočnú úroveň vedomostí v posudzovaných oblastiach, zatiaľ čo 24 neuspelo. Najvyššiu úspešnosť, t.j. správnosť odpovedí (89,95 %), dosiahli respondenti v oblasti polohovania a pohybového vývinu dieťaťa. Naopak, najväčší deficit vedomostí sa prejavil v oblasti správnej manipulácie s dieťaťom (49,67 %) a používania pomôcok ovplyvňujúcich pohybový vývin (55,15 %). Štúdia potvrdila, že rodičia majú nedostatky vo vedomostiach o správnej manipulácii s dieťaťom a o vplyve pomôcok na jeho pohybový vývin.

Kľúčové slová: dieťa do jedného roka, pohybový vývin, hrubá a jemná motorika, manipulácia s dieťaťom, pohybová stimulácia, vedomosti rodičov

Úvod

Pohybový vývin dieťaťa, označovaný aj ako motorický vývin, je neoddeliteľnou súčasťou celkového fyzického, kognitívneho a sociálneho vývinu. Predstavuje dynamický a postupný proces, v rámci ktorého dieťa získava kontrolu nad vlastným telom, osvojuje si pohybové schopnosti a postupne dosahuje motorické míľniky, ako sú udržanie hlavy, pretáčanie, sedenie, lozenie a chôdza (Dvořáková, 2014; Beekun et al., 2022). Tento proces nie je len prejavom rastu a dozrievania centrálného nervového systému (Silva et al., 2023), ale aj základom pre neskoršie komplexné pohybové vzorce, ktoré ovplyvňujú kvalitu života jednotlivca.

Motorický vývin možno rozdeliť na hrubú a jemnú motoriku. Hrubá motorika zahŕňa pohyby veľkých svalových skupín potrebných na stabilitu, koordináciu a mobilitu, zatiaľ čo jemná motorika sa týka precíznych pohybov rúk a prstov nevyhnutných na manipuláciu s objektmi (Kiedroňová, 2010). Správny vývin oboch oblastí je kľúčový pre samostatnosť dieťaťa v neskoršom veku a jeho schopnosť

efektívne interagovať s prostredím. Z tohto dôvodu je dôležité skúmať faktory, ktoré motorický vývin ovplyvňujú, ako aj spôsoby jeho podpory v ranom detstve.

Motorický vývin je determinovaný kombináciou vnútorných a vonkajších faktorov. Medzi vnútorné faktory patria genetické predispozície, dozrievanie nervovej sústavy a individuálne rozdiely vo vývine. Výskumy ukazujú, že aj pri relatívne normálnom priebehu vývinu môžu existovať variácie v časovom dosahovaní motorických míľnikov (Hadders-Algra, 2018). Vonkajšie faktory zahŕňajú prostredie, stimuláciu a interakciu s rodičmi, pričom dôležitým prvkom je práve kvalita starostlivosti, ktorú dieťa dostáva. Dostatočná stimulácia prostredníctvom pohybových aktivít, podpora spontánneho pohybu a vytvorenie podnetného prostredia môžu výrazne ovplyvniť rýchlosť a kvalitu pohybového vývinu (Matušková et al., 2021). Naopak, nedostatok stimulácie alebo nadmerná pasivita môžu viesť k oneskoreniam vo vývine, čo môže mať dlhodobé dôsledky na motorické aj kognitívne schopnosti dieťaťa.

Dôležitú úlohu v podpore pohybového vývinu zohráva správna manipulácia s dieťaťom, tzv. handling. Zahŕňa spôsoby, akým dieťa dvíhame, pokladáme a nosíme, pričom rešpektuje jeho prirodzené pohybové vzorce, čím podporuje symetriu tela (Emmersberger, 2022). Správna manipulácia je kľúčová nielen pre prevenciu asymetrií a svalových dysbalancií, ale aj pre podporu posturálnej kontroly, ktorá je nevyhnutná pre ďalší motorický pokrok. Okrem manipulácie je dôležité aj pravidelné polohovanie dieťaťa, najmä časté ukladanie na bruško, tzv. tummy time, ktoré posilňuje svaly potrebné na kontrolu pohybov hlavy, pretáčanie a neskôr aj sedenie a lozenie (Hewitt et al., 2020). Nedostatočné polohovanie môže viesť k oslabeniu posturálnych svalov, svalovým dysbalanciám a dokonca aj k deformitám lebky (Zachry et al., 2017).

Vplyv na pohybový vývin môžu mať aj pomôcky, ktoré rodičia používajú pri starostlivosti o dieťa. Ergonomické nosiče a šatky môžu byť užitočné, ak sú používané správne, avšak nesprávna technika nosenia, napríklad časté nosenie smerom od tela, môže negatívne ovplyvniť držanie tela a rovnováhu dieťaťa (Norholt, 2020). Niektoré komerčne dostupné pomôcky, ako napríklad chodítka, či nadmerné používanie autosedačiek, môžu viac škodiť ako pomáhať, pretože obmedzujú prirodzený pohyb a môžu viesť k nesprávnemu vývinu chrbtice a dolných končatín (Gregora, Dokoupilová et al., 2016; Chagas et al., 2020). Aj oblečenie zohráva významnú úlohu – príliš tesné nohavice alebo hrubé plienky môžu obmedziť pohyblivosť bedrových kĺbov a nepriaznivo ovplyvniť držanie tela (Ueda et al., 2021). V prípade obuvi je dôležité, aby bolo dieťa čo najdlhšie naboso, čo podporuje prirodzený vývin chodidiel a posilňuje svaly dolných končatín (Hodgson et al., 2020).

Zásadnú úlohu pri monitorovaní motorického vývinu zohrávajú zdravotnícki pracovníci, najmä sestry, ktoré sa podieľajú na včasnom rozpoznávaní rizík a edukácii rodičov. Skriningové nástroje, ako napríklad Test of Infant Motor Performance (TIMP) či Ages and Stages Questionnaire Developmental Screening System (ASQ), umožňujú identifikovať riziká oneskoreného vývinu a zabezpečiť vhodné

intervencie (NANDA International, 2021). Edukácia rodičov by mala zahŕňať informácie o správnej manipulácii s dieťaťom, o jeho polohovaní, výbere vhodných pomôcok a podpore spontánnej motorickej aktivity.

Pohybový vývin dieťaťa je komplexný proces ovplyvnený mnohými faktormi, pričom vhodná stimulácia, manipulácia a polohovanie sú kľúčovými prvkami v prevencii oneskoreného vývinu. Úlohu v tomto procese zohrávajú nielen rodičia, ale aj zdravotnícki pracovníci, ktorí svojou edukáciou a včasnými intervenciami môžu zabezpečiť optimálny vývin každého dieťaťa.

Cieľ

Cieľom štúdie bolo zistiť vedomosti a prípadný deficit vedomostí u rodičov v problematike správnej manipulácie s dieťaťom a správneho pohybového vývinu dieťaťa do prvého roku života.

Metodika

Na zber empirických údajov sme použili dotazník vlastnej konštrukcie, zostavený na základe štúdií odbornej literatúry. Pri tvorbe jeho položiek sme vychádzali z viacerých zdrojov (Kiedroňová, 2010; Gregora, Dokoupilová, 2016; Siddicky et al., 2020; Hodgson et al., 2021; Kačírková, Rybová, 2022; Kachlová et al., 2022; Norholt et al., 2022). Dotazník obsahoval 37 otázok, pričom bol rozdelený na dve časti. Prvá časť skúmala vedomosti rodičov o správnom pohybovom vývine dieťaťa do jedného roka, rozdelená je do siedmich oblastí: polohovanie, manipulácia, sed a lezenie, nosenie a balenie, vplyv pomôcok, oblečenie a obuv. Druhá časť obsahovala otázky týkajúce sa demografických údajov respondentov (pohlavie, vek, počet detí, vzdelanie). Dotazník bol distribuovaný v papierovej forme a zber údajov prebiehal od decembra 2023 do marca 2024.

Na vyhodnotenie empirických údajov sme použili jednorozmernú deskriptívnu štatistiku, a to absolútnu početnosť odpovedí, aritmetický priemer, modus, smerodajnú odchýlku, minimum a maximum. Hodnotili sme percentuálnu úspešnosť správnosti odpovedí na otázky dotazníka, pričom sme stanovili päť stupňov úspešnosti (100–91 %, 90–81 %, 80–73 %, 72–66 %, 65–60 %) a neúspešnosť (59 % a menej). Vyhodnotili sme celkovú mieru úspešnosti každej posudzovanej oblasti, najmenej a najviac úspešné položky a individuálne percentuálne hodnotenie jednotlivých položiek.

Výskumný súbor

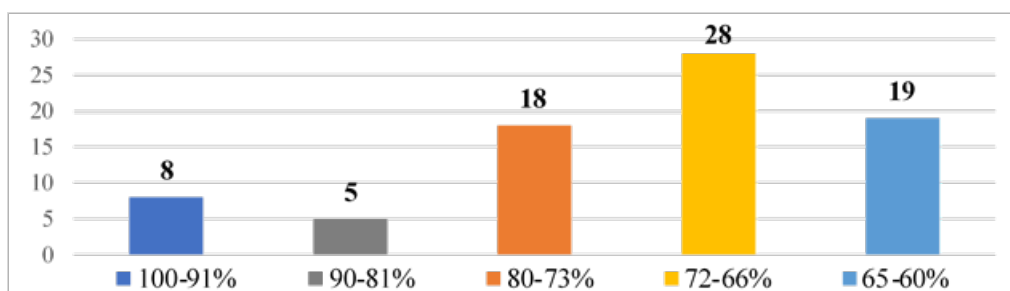
Výskumný súbor bol zostavený zámerným výberom na základe stanovených inkluzívnych a exkluzívnych kritérií. Do výskumu boli zaradení rodičia minimálne jedného dieťaťa, vo veku 18 a viac rokov, ktorí súhlasili s účasťou na výskume. Vylúčení boli rodičia detí s poruchou pohybového vývinu, rodičia mladší ako 18 rokov a tí, ktorí nesúhlasili s účasťou.

Zber údajov prebiehal kombinovaným spôsobom, kedy priamy kontakt a distribúciu dotazníkov zabezpečovala jedna z autoriek štúdie, na základe kontaktov na vhodných respondentov sprostredkovaných intermediármi, ako sú spolužiaci, príbuzní, priatelia a susedia. Respondenti boli oboznámení s účelom výskumu, dobrovoľnosťou účasti, anonymitou a využitím údajov výlučne pre účely spracovania tejto témy formou bakalárskej práce a publikácií z nej vyplývajúcich. Po poskytnutí informovaného súhlasu vyplňali dotazník v domácom prostredí bez časového obmedzenia. Zo 140 distribuovaných dotazníkov bolo vrátených 116 (návratnosť 82,86 %). Po vyradení 14 nevyhovujúcich dotazníkov (neúplné odpovede alebo nesplnenie inkluzívnych kritérií) tvorilo finálny výskumný súbor 102 respondentov.

Demografické údaje ukázali, že väčšinu respondentov tvorili ženy ($n = 71$). Vek respondentov sa pohyboval od 19 do 44 rokov, pričom priemerný vek bol 30 rokov (29,96 rokov). Počet detí bol rovnomerne rozdelený medzi rodičov s jedným ($n = 34$) a dvomi deťmi ($n = 34$), zvyšný počet respondentov mal 3 a viac detí.

Interpretácia výsledkov

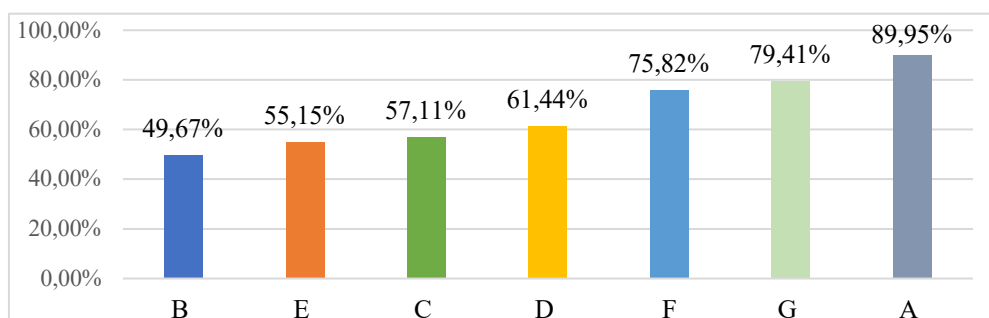
V rámci interpretácie výsledkov sme primárne analyzovali úroveň vedomostí rodičov v jednotlivých oblastiach súvisiacich s pohybovým vývinom dieťaťa do jedného roka. Analýza odpovedí ukázala, že 78 respondentov preukázalo dostatočnú úroveň vedomostí v posudzovaných oblastiach, zatiaľ čo 24 neuspelo. Najvyššiu celkovú úspešnosť odpovedí v rozsahu 100–91 % dosiahlo 8 respondentov, najmenej zastúpenou skupinou boli respondenti s úspešnosťou na úrovni 90–81 % ($n = 5$). Úspešnosť odpovedí na úrovni 80–73 % dosiahlo 18 respondentov. Najpočetnejšou skupinou boli respondenti s úspešnosťou 72–66 % ($n = 28$), zatiaľ čo úspešnosť na úrovni 65–60 % dosiahlo 19 respondentov (graf 1).



Graf 1.

Percentuálna úspešnosť odpovedí respondentov na posudzované oblasti

Na základe výsledkov jednotlivých položiek v posudzovaných oblastiach sme individuálne vyhodnotili úspešnosť každej oblasti dotazníka od A-G (graf 2).



Graf 2. Celková úspešnosť posudzovaných oblastí dotazníka Legenda

- A - Polohovanie a pohybový vývin dieťaťa
- B - Manipulácia s dieťaťom
- C - Sed, lezenie po štyroch, stoj
- D - Nosenie a balenie dieťaťa
- E - Pomôcky a vplyv na pohybový vývin
- F - Oblečenie
- G – Obuv

Najvyššiu úspešnosť dosiahla oblasť A (89,95 %), ktorá zahŕňala otázky týkajúce sa správneho polohovania a podpory pohybového vývinu dieťaťa. Naopak, najvýraznejší deficit vedomostí sa prejavil v oblasti B (49,67 %), ktorá hodnotila správnu manipuláciu s dieťaťom. Nedostatočné vedomosti sa ukázali aj v oblasti E (55,15 %), zameranej na používanie pomôcok ovplyvňujúcich pohybový vývin, a v oblasti C (57,11 %), ktorá sa venovala vývinovým míľnikom, ako sú sed, lezenie po štyroch a stoj.

Pri podrobnej analýze položiek v rámci jednotlivých oblastí sme vyhodnocovali úroveň vedomostí respondentov a identifikovali najúspešnejšie a najmenej úspešné položky.

V oblasti A (Polohovanie a pohybový vývin dieťaťa) bola najlepšie zodpovedanou otázkou položka A1 (n = 95; 93,14 %): „Pri hodnotení naučených pohybov dieťaťa je dôležitejšia ich postupnosť, kvalita a symetria než rýchlosť ich osvojenia.“ Najnižšiu úspešnosť dosiahla položka A4 (n = 89; 87,25 %), v ktorej respondenti nesprávne identifikovali tvrdenie týkajúce sa predilekčného držania hlavičky dieťaťa.

V oblasti B (Manipulácia s dieťaťom) bol najväčší deficit vedomostí zaznamenaný pri položke B2 (n = 76; 74,51 %), ktorá sa zameriavala na správne techniky manipulácie pri prebaľovaní. Najúspešnejšia bola položka B1 (n = 93; 91,18 %), kde respondenti správne identifikovali význam dlhodobého dodržiavania zásad správnej manipulácie pre pohybový vývin dieťaťa.

Vedomosti o motorickom vývine boli hodnotené v oblasti C. Najvyššiu úspešnosť zaznamenala položka C2 (n = 74; 72,55 %): „Ak dieťa sedí v tzv. W-sede, je potrebné ho motivovať k iným alternatívnym spôsobom sedenia.“ Naopak, najnižšiu úspešnosť dosiahla položka C4 (n = 57; 55,88 %), ktorá hodnotila informovanosť o dôsledkoch predčasného postavovania dieťaťa na nohy.

Oblasť D (Nosenie a balenie dieťaťa) odhalila najnižšiu úspešnosť v položke D1 (n = 50; 49,02 %), kde respondenti mali identifikovať správnu techniku nosenia dieťaťa. Naopak, najlepšie zodpovedaná bola položka D3 (n = 81; 79,41 %), ktorá sa zameriavala na balenie novorodenca do zavinovačky.

Vedomosti o vhodných pomôckach na podporu pohybového vývinu boli sledované v oblasti E. Najvyššiu úspešnosť dosiahla položka E2 (n = 77; 75,49 %), ktorá hodnotila vplyv ortopedických podloží na pohybový vývin. Najväčší deficit vedomostí bol zaznamenaný pri položke E1 (n = 62; 60,78 %), týkajúcej sa výberu vhodných pomôcok.

Oblasť F (Oblečenie) sledovala informovanosť rodičov o výbere vhodného odevu podporujúceho pohybový vývin. Najviac správnych odpovedí mala položka F2 (n = 83; 81,37 %), týkajúca sa výberu nohavíc. Naopak, najnižšiu úspešnosť dosiahla položka F3 (n = 33; 32,35 %), ktorá sa venovala výberu tričiek a plienok.

V oblasti G (Obuv) bola najlepšie zodpovedaná položka G3 (n = 98; 96,08 %), hodnotiaca vplyv obuvi na pohybový vývin. Najväčší deficit vedomostí bol zaznamenaný pri položke G1 (n = 42; 41,18 %), v ktorej respondenti nevedeli správne určiť optimálny čas, kedy začať dieťa obúvať.

Diskusia a záver

Podpora pohybového vývinu dieťaťa v prvom roku života zahŕňa množstvo aspektov, medzi ktoré patrí aj vytvorenie bezpečného a stimulujúceho prostredia. Kľúčovú úlohu v tomto procese zohrávajú rodičia, ktorí môžu prostredníctvom informovaného prístupu významne ovplyvniť optimálny motorický rozvoj svojho dieťaťa až do dospelosti. Naša štúdia sa preto zamerala na hodnotenie vedomostí rodičov v oblastiach významných pre zdravý pohybový vývin.

V oblasti polohovania a pohybového vývinu dosiahli respondenti najvyššiu úspešnosť spomedzi všetkých hodnotených oblastí. Správne polohovanie má viacero pozitívnych vplyvov na pohybový vývin dieťaťa, vrátane prevencie polohovej plagiocefálie (Williams, Galea, 2023). Výskumy odporúčajú pravidelné menenie polohy hlavičky dieťaťa počas spánku, čím sa znižuje riziko asymetrie lebky (Moon et al., 2022). Napriek tomu sme v našom súbore zaznamenali nižšiu mieru správnych odpovedí práve v otázkach týkajúcich sa tejto problematiky. Výsledky naznačujú potrebu lepšej informovanosti rodičov o správnych polohovacích technikách, ktoré môžu podporiť symetrický rast a správny vývin pohybového aparátu dieťaťa.

Ďalším významným faktorom podporujúcim optimálny pohybový vývin je správna manipulácia s dieťaťom, označovaná aj pojmom handling. Táto technika zahŕňa spôsob, akým rodičia s dieťaťom

zaobchádzajú pri každodenných činnostiach a môže ovplyvniť vývin pohybových vzorcov (Kachlová et al., 2022). Kiedroňová (2005) považuje správnu manipuláciu v prvých mesiacoch života za základ prevencie porúch pohybového vývinu. V našej štúdii bola táto oblasť hodnotená ako najmenej úspešná. Najvýraznejší deficit vedomostí bol zaznamenaný v položke týkajúcej sa správnej manipulácie pri prebaľovaní, kde respondenti mali označiť správny spôsob manipulácie na základe ponúknutých fotografií. Výskumy poukazujú na to, že symetrická manipulácia, pri ktorej sa hmotnosť dieťaťa rovnomerne rozkladá a dochádza k natáčaniu na oba boky, je najvhodnejším spôsobom prebaľovania (Kachlová et al., 2022). Nesprávna manipulácia, ako napríklad zdvíhanie dieťaťa za nohy, môže negatívne ovplyvniť vývin bedrových kĺbov, ktoré nie sú dostatočne zrelé (Kačírková, Rybová, 2022). Nízka úspešnosť v tejto oblasti môže súvisieť s rôznorodými odporúčaniami dostupnými v rodičovských zdrojoch (Schreierová, 2018).

V oblasti sedu, lezenia a chôdze sme zaznamenali najväčší deficit vedomostí v otázkach týkajúcich sa predčasného postavovania dieťaťa na nohy a snahy rodičov predčasne podporiť chôdzu dieťaťa. Tento jav môže súvisieť s nesprávnym presvedčením rodičov, že skoršie postavenie sa a chôdza znamenajú rýchlejší vývin dieťaťa. Výskumy však naznačujú, že urýchlenie motorického vývinu môže viesť k nesprávnym pohybovým vzorcom a následným problémom v držaní tela (Kačírková, Rybová, 2022). Správne nosenie dieťaťa je ďalším dôležitým faktorom v podpore pohybového vývinu. Nosenie umožňuje blízky kontakt medzi rodičom a dieťaťom, pričom ovplyvňuje nielen motorický, ale aj sociálny a emocionálny vývin (Norholt, 2020). Výsledky našej štúdie ukázali, že respondenti mali výrazný deficit vedomostí v tejto oblasti, najmä v otázkach týkajúcich sa správnej techniky nosenia. Ako optimálna bola označená poloha „klokan“, pri ktorej je dieťa otočené chrbtom k rodičovi a hlavičku si opiera o jeho hrudník (Kiedroňová, 2002; Kačírková, Rybová, 2022). Nesprávne nosenie, pri ktorom dieťa nemá oporu hlavičky alebo je otočené tvárou k rodičovi, môže spôsobovať nadmerný tlak na chrbticu a viesť k nesprávnemu držaniu tela (Kačírková, Rybová, 2022). Výsledky naznačujú potrebu lepšej edukácie rodičov v tejto oblasti.

Pri podpore správneho pohybového vývinu rodičia často využívajú rôzne pomôcky, avšak nie všetky sú vhodné. Naše výsledky ukázali nedostatočné vedomosti rodičov o výbere vhodných pomôcok. Chodítka a podobné pomôcky, ktoré mnohí rodičia považujú za bezpečné a prospešné, môžu v skutočnosti predstavovať riziko pre pohybový vývin dieťaťa (Gregora, Dokoupilová, 2016). Niektoré štúdie poukazujú na to, že rodičia využívajú tieto pomôcky nielen na podporu vývinu, ale aj z praktických dôvodov, keďže im umožňujú vykonávať iné činnosti (Batra et al., 2015; Kačírková, Rybová, 2022). Táto skutočnosť môže vysvetľovať nízku úspešnosť odpovedí respondentov v tejto oblasti.

Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že respondenti si uvedomujú význam správneho obliekania pri podpore pohybového vývinu. Väčšina rodičov správne identifikovala potrebu dostatočného priestoru

pre nohy a prsty pri výbere oblečenia, čím sa predchádza obmedzeniu pohybu dolných končatín. Tento poznatok je v súlade s výskumami, ktoré zdôrazňujú význam voľného strihu oblečenia pre podporu správneho vývinu dolných končatín (Ueda et al., 2021; Kačírková, Rybová, 2022).

Oblasť týkajúca sa výberu vhodnej obuvi predstavovala najúspešnejšiu sekciu dotazníka. Výsledky naznačujú vysoké povedomie rodičov o dôležitosti správnej obuvi, ktorá podporuje prirodzený vývoj klenby, svalov chodidiel a rozvoj koordinácie a rovnováhy, čo je v súlade s odporúčaniami Dufeka et al. (2013). Napriek tomu určitá časť respondentov nepoznala vhodný čas, kedy začať dieťaťu obúvať topánky. Viaceré výskumy upozorňujú, že predčasné obúvanie môže negatívne ovplyvniť senzorické vnímanie a motorický vývin chodidla (Dufek et al., 2013; Kačírková, Rybová, 2022).

Na základe získaných výsledkov môžeme konštatovať, že hoci si rodičia uvedomujú význam podpory pohybového vývinu svojho dieťaťa, v niektorých kľúčových oblastiach pretrvávajú významné deficity vedomostí. Týka sa to najmä vedomostí o správnej manipulácii s dieťaťom, technikách nosenia a vhodnosti pomôcok na podporu motorického rozvoja.

Použitá literatúra

Batra E K, et al. Hazards Associated with Sitting and Carrying Devices for Children Two Years and Younger. *The Journal of Pediatrics* . 2015 Jul 167(1): 183-187.

Beekun M V, et al. The associations between stunting and wasting at 12 months of age and developmental milestones delays in a cohort of Cambodian children. *Scientific Reports* 2022 Oct 25;12(1):17859.

Chagas P S C, et al. Effects of baby walker use on the development of gait by typically developing toddlers. *Gait Posture*. 2020 Feb 76: 231-237.

Dufek J S, et al. Choosing children's shoes: Mechanical considerations. *Lower Extremity Review* [online]. [cit. 2024-01-15]. Dostupné z: <https://lermagazine.com/article/choosing-childrens-shoes-mechanical-considerations>

Dvořáková H. Rozvíjíme tělesnou zdatnost dětí. Praha: Raabe. 2014;168 s.

Emmersberger L. Kinästhetik Infant Handling: Entwicklung und Lernen. *Hebammen Praxis*. 2022 1; 3:43-45.

Gregora M, Dokoupilová M. Péče o novorozence a kojence. Praha: Grada Publishing. 2016;128s.

Hadders – Algra M. Early human motor development: From variation to the ability to vary and adapt. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2018 Jul;90:411-427.

Hewitt L, et al. Tummy Time and Infant Health Outcomes: A Systematic Review. *American Academy of Pediatrics* . 2020 Jun;145(6):e20192168.

Hodgson L, et al. First steps: Parent health behaviours related to children's foot health. *Journal of Child Health Care* . 2020 Jun;24(2):221-232.

Hodgson L, et al. The "price-tag" of foot health in infancy and early childhood: a cross sectional survey of UK parents. *European Journal of Pediatrics*. 2021 May;180(5):1561-1570.

Kačírková M, Rybová Z. Pohybový vývoj dítěte s láskou a respektem. Praha: Esence. 2022;168 s.

Kachlová M, et al. Ošetrovatelská péče v neonatologii. Praha: Grada Publishing. 2022;183 s.

Kiedroňová E. Něžná náruč rodičů. Praha: Grada Publishing. 2005;304 s.

Kiedroňová E. Rozvíjej se, děťátko. Praha: Grada Publishing. 2010;379 s.

Matušková O. Štandard vyšetrení psychomotorického vývinu detí pri 2.- preventívnej prehliadke v primárnej starostlivosti - 1. revízia. Bratislava: Ministerstvo zdravotníctva SR. 2021 NANDA International. Nursing diagnoses: Definitions and classification 2021-2023. New York: Thieme Medical Publishers. 2021;592 s.

Norholt H. 2020. Revisiting the roots of attachment: A review of the biological and psychological effects of maternal skin-to-skin contact and carrying of full-term infants. *Infant Behavior and Development*. 2020 Aug;60:101441.

Norholt H, et al. Babywearing Practices and Effects on Parental and Child Physical and Psychological Health. *Academic Journal of Pediatrics & Neonatology*. 2022; 11(5): 555876.

Schreierová, V. Handling a nošení dětí: S rozumem a láskou v hrsti. vlastní náklad. 2018;123 s.

Siddicky S F, et al. Positioning and baby devices impact infant spinal muscle activity. *Journal of Biomechanics* 2020 May 7;104:109741.

Silva B F V, et al. "I Am Afraid of Positioning my Baby in Prone": Beliefs and Knowledge about Tummy Time Practice. *International Journal of Pediatrics*. 2023 Apr 19;2023:4153523.

Ueda T, et al. Effect of wearing diapers on toddler's gait. *Scientific Reports* 2021 Oct 11;11(1):20105.

Zachry A H, et al. Infant Positioning, Baby Gear Use, and Cranial Asymmetry. *Maternal and Child Health Journal*. 2017 Dec;21(12):2229-2236.

Williams E, Galea M. Another look at "tummy time" for primary plagiocephaly prevention and motor development. In: *Infant Behavior and Development*. 2023 May;71:101839.

Vplyv fajčenia na citlivosť kašľového reflexu

Neuschlová M.¹, Kunč P.^{1,2}, Péčová R.^{1*}

¹ Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzita Komenského v Bratislave

² Klinika detskej tuberkulózy a respiračných chorôb JLF UK Dolný Smokovec, Národný ústav detskej tuberkulózy a respiračných chorôb Dolný Smokovec

* korešpondenčný autor

prof. MUDr. Renata Péčová, PhD., MPH

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Univerzita Komenského v Bratislave

Ústav patologickej fyziológie

Malá Hora 4C

036 01 Martin

tel: +421 43 2633 622

e-mail: renata.pecova@uniba.sk

Abstract

Cough is a common symptom among cigarette smokers. This study determined whether chronic cigarette smoking is associated with changes in capsaicin-induced cough response. Cough reflex sensitivity to capsaicin was performed according to the European Respiratory Society guidelines for cough assessment. Concentrations of capsaicin causing two or more (C₂) and five or more (C₅) cough efforts were reported for each test. The study involved baseline spirometry followed by capsaicin cough challenge testing in 16 healthy adult smokers and 39 healthy adult nonsmokers. Our results showed increased cough reflex sensitivity to inhaled capsaicin in cigarette smokers compared to healthy nonsmokers. However, we did not observe a statistically significant difference in cough reflex sensitivity for both values (C₂ and C₅) between smokers and nonsmokers.

Keywords: cough, cough reflex sensitivity, cigarette smokers, capsaicin

Úvod

Kašľový reflex je životne dôležitý obranný mechanizmus, ktorý zabraňuje aspirácii, odstraňuje nahromadené sekréty z dýchacích ciest a zvyšuje ich priechodnosť (Morice et al., 2020). Ak je však neprimerane intenzívny a dlhotrvajúci, zaťažuje organizmus, znižuje kvalitu života a môže viesť ku komorbiditám, sociálnej izolácii, depresii (Chamberlain et al., 2015). Cigaretový dym je jednou

z najčastejších látok, ktoré dráždia dýchacie cesty. U nefajčiarov môže už vdýchnutie malého množstva cigaretového dymu vyvolať podráždenie dýchacích ciest a prudký kašeľ (Kanezaki et al., 2012). Cigaretový dym, v ktorom sa nachádza približne 5000 rôznych chemických zložiek vrátane nikotínu, reaktívnych foriem kyslíka a nenasýtených aldehydov (Kanezaki et al., 2012), je detegovaný prostredníctvom receptorov a iónových kanálov (napr. TRPV₁, TRPA₁, TRPV₄, AAIC, P₂X₃) lokalizovaných na aferentných nervových zakončeníach nervus vagus v sliznici dýchacích ciest a ich aktivácia vedie ku kaskáde zmien, dôsledkom ktorých je vznik kašľa (Belvisi et al., 2016). Aktivita aferentných nervových zakončení v dýchacích cestách (citlivosť kašľového reflexu) je dynamický jav, ktorý je ovplyvnený aj environmentálnymi faktormi ako napr. prítomnosťou cigaretového dymu (Sitkauskienė et al., 2007). Poškodenia, ktoré vznikajú u aktívnych fajčiarov a aj tých, ktorí sú pasívne vystavení cigaretovému dymu, vznikajú prostredníctvom viacerých patofyziologických mechanizmov vrátane oxidačného stresu, zápalu, dysfunkcie endotelu, aktivácie trombocytov a poškodenia DNA (Ma and Li, 2017; Klein, 2022; Agrawal, 2024).

Cieľom našej štúdie bolo sledovať vplyv fajčenia na citlivosť kašľového reflexu (CKR) u zdravých dospelých fajčiarov s využitím štandardizovanej metodiky vyšetrenia kašľovej senzitivity podľa odporúčaní Európskej respirologickej spoločnosti (ERS) (Morice et al., 2007).

Materiál a metódy

Klinicko-fyziologickej štúdie sa zúčastnilo 55 zdravých dospelých dobrovoľníkov (16 fajčiarov a 39 nefajčiarov). V období posledných štyroch týždňov pred vyšetrením neprekonali žiadne infekčné ochorenie respiračného traktu, mali negatívnu anamnézu na alergické, respiračné, kardiovaskulárne, gastrointestinálne alebo endokrinné ochorenia a neužívali ACE inhibítory. Ženy neboli v čase vyšetrovania tehotné. Všetci fajčiari zaradení do štúdie boli pravidelní fajčiari (tabuľka 1), žiadny z nich neprerušil fajčenie alebo sa nepokúšal prestať fajčiť v poslednom roku pred vyšetrením citlivosti kašľového reflexu. Minimálne 60 minút pred vykonaním kašľového testu dobrovoľníci zaradení do štúdie nejedli a necvičili. Fajčiari boli poučení, že nemajú fajčiť najmenej 60 minút pred vykonaním kašľového testu. Pred vyšetrením všetci dobrovoľníci vyplnili dotazník, na základe ktorého sme získali potrebné informácie o ich zdravotnom stave. Po informovaní o priebehu vyšetrenia podpísali informovaný súhlas. Pred vyšetrením CKR a po tomto vyšetrení sme uskutočnili skriningové spirometrické vyšetrenie. Štúdia bola schválená Etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine a Etickou komisiou Žilinského samosprávneho kraja.

Metodika zisťovania CKR u zdravej dospeljej populácie

Pri zisťovaní CKR sme postupovali podľa presných smerníc ERS (Morice et al., 2007). Na meranie CKR sme použili inhalačnú jednodychovú metodiku dávka-odpoveď, pretože je presná a reprodukovateľná

pri dodržanej dávke a pomocou tejto metodiky môže byť jednoducho vyvolaná odpoveď na tusigénnu látku. Ako tusigénnu látku sme použili kapsaicín (SIGMA). Na zabezpečenie identickej rýchlosti inspiračného prietoku počas každej inhalácie aerosólu sme použili nebulizátor (KoKo DigiDoser; nSpire health Inc. Louisville, CO, USA), modifikovaný pridaním ventilu regulujúceho inspiračný prietok (RIFR; nSpire health Inc, Louisville, CO, USA). Ventil limituje rýchlosť inspiračného prietoku na 0,5 l/s bez ohľadu na inspiračné úsilie. Pri použití jednoduchovej metodiky je tusigénna odpoveď na každú dávku aerosólu okamžitá a krátka, preto sme počítali iba zakašľania, ktoré sa vyskytli počas prvých 15 s od inhalácie aerosólu kapsaicínu. Vdychy sa uskutočnili v 1-minútových intervaloch (Morice et al., 2007). Účastníkov sme poučili, že nemajú hovoriť bezprostredne po inhalácii, nemajú potláčať nutkanie na kašeľ, môžu kašľať keď potrebujú a koľko potrebujú. Nemali informáciu, že uvedenie špecifického počtu zakašľaní je koncový bod vyšetrenia. Vyšetrenie sme začali inhaláciou fyziologického roztoku a pokračovali sme inhaláciou roztokov kapsaicínu v postupne zvyšujúcich sa koncentráciách (0,49 – 1000 $\mu\text{mol/l}$) počas 1200 ms v jednominútových intervaloch. Randomizovane v priebehu vyšetrenia sme aplikovali kontrolný fyziologický roztok kvôli objektivizácii vyšetrenia. Tento prístup znižuje riziko voluntárneho potlačenia alebo vyvolania kašľa. Pri každom vyšetrení sme zaznamenávali koncentráciu kapsaicínu, ktorá vyvolala dve a viac (C_2) a päť a viac (C_5) zakašľaní. V prípade, ak vyšetrovaný nedosiahol C_5 , ukončili sme vyšetrenie inhaláciou najvyššej pripravenej koncentrácie – 1000 $\mu\text{mol/l}$. Po aplikácii jednotlivých dávok aerosólu kapsaicínu sme zároveň u vyšetrovaných zaznamenávali ich subjektívne pocity.

Štatistické spracovanie

Vypočítaný bol geometrický priemer a 95% interval spoľahlivosti prahovej koncentrácie kapsaicínu vyvolávajúcej kašeľ. Výsledky boli štatisticky spracované v štatistickom programe Statgraph pomocou neparametrického Wilcoxonovho testu, pričom za štatisticky významný rozdiel v porovnávaných skupinách bola považovaná hodnota $P < 0,05$.

Výsledky

Všetci účastníci dokončili kašľový test. Ani napriek podaniu najvyšších použitých koncentrácií kapsaicínu nedosiahli dvaja účastníci parameter C_2 ani C_5 (jedna žena a jeden muž) a jedna žena nedosiahla parameter C_5 . Týchto účastníkov sme vyradili zo štúdie. Celkový počet účastníkov zaradených do štúdie sa znížil na 14 fajčiarov a 38 nefajčiarov. Charakteristiky účastníkov sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1 Charakteristiky účastníkov štúdie

Charakteristiky účastníkov	Fajčiari (n = 14)	Nefajčiari (n = 38)
Vek: priemer \pm SD	38,79 \pm 11,88	32,03 \pm 10,87
Vek: median	40,0	29,5
Pohlavie: mužské, n (%)	9 (64,29 %)	19 (50,00 %)
Pohlavie: ženské, n (%)	5 (35,71 %)	19 (50,00 %)
Aktívne fajčenie 20 a viac rokov, n (%)	6 (42,86 %)	0
Viac ako 10 cigariet/deň, n (%)	5 (35,71 %)	0

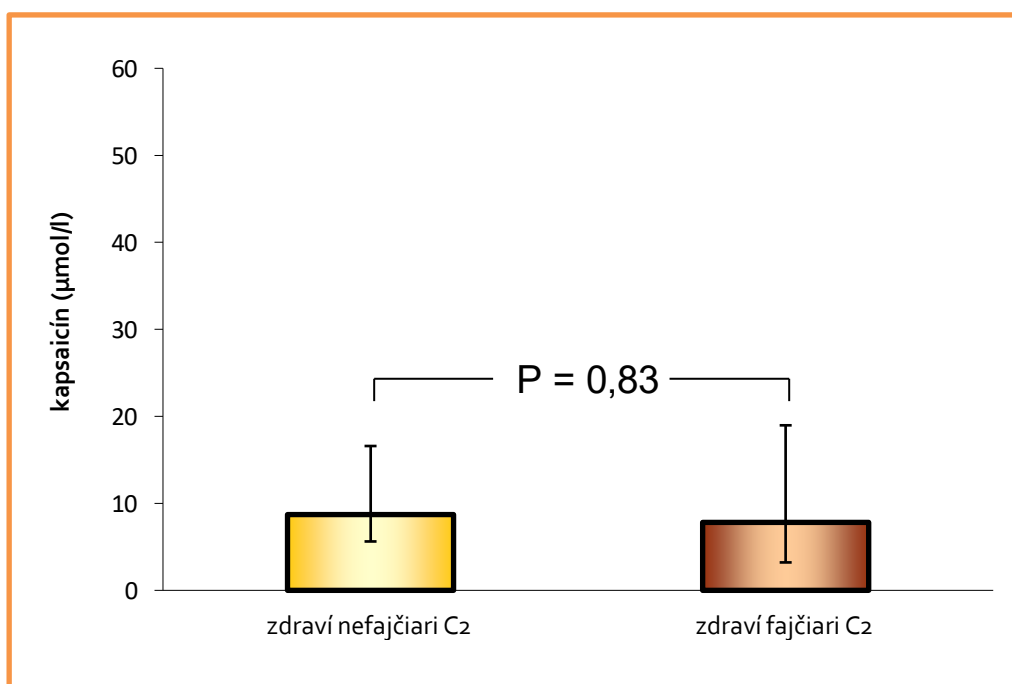
Vysvetlivky: SD – smerodajná odchýlka

Koncentrácia kapsaicínu, ktorá vyvolala u nefajčiarov najmenej dve zakašľania (C₂), bola 8,71 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI: 5,62 – 13,50 $\mu\text{mol/l}$). V porovnaní s fajčiarmi, u ktorých mal parameter C₂ hodnotu 7,81 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI: 3,21 – 18,97 $\mu\text{mol/l}$) a bol nižší ako u nefajčiarov, avšak bez signifikantného rozdielu medzi oboma skupinami, P = 0,83 (tabuľka 2, obrázok 1). Koncentrácia kapsaicínu, ktorá vyvolala najmenej päť zakašľaní (C₅), bola u nefajčiarov 31,81 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI: 20,52 – 49,33 $\mu\text{mol/l}$). U fajčiarov mal parameter C₅ hodnotu 16,41 $\mu\text{mol/l}$ (95% CI: 6,53 – 41,25 $\mu\text{mol/l}$), čo bolo nižšie ako u nefajčiarov, avšak signifikantné rozdiely sme nezistili ani pri tomto parametri, P = 0,14 (tabuľka 2, obrázok 2). Pri sledovaní oboch parametrov C₂ aj C₅ neboli zistené štatisticky významné rozdiely medzi skupinami fajčiarov a nefajčiarov.

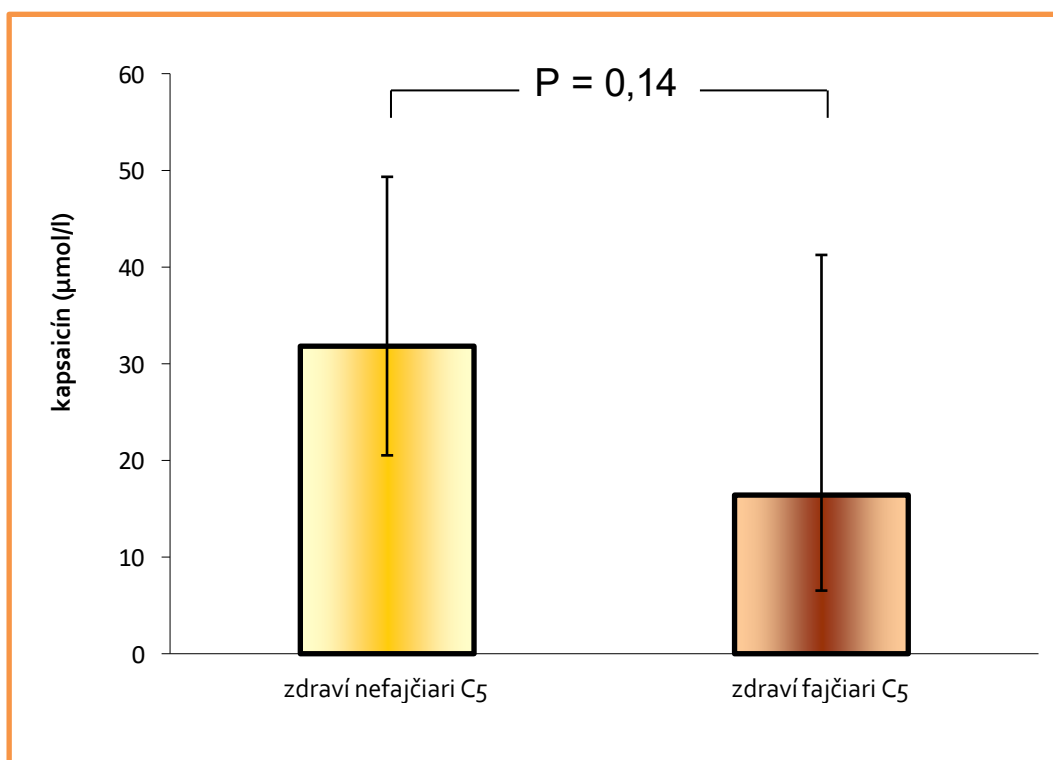
Tab. 2 Geometrický priemer parametrov C₂ a C₅ u zdravých dospelých fajčiarov a kontrolnej skupiny zdravých dospelých nefajčiarov v $\mu\text{mol/l}$ a 95% interval spoľahlivosti

	parameter C ₂ (95% CI)	parameter C ₅ (95% CI)
Zdraví nefajčiari	8,71 (5,62 – 13,50)	31,81 (20,52 – 49,33)
Zdraví fajčiari	7,81 (3,21 – 18,97)	16,41 (6,53 – 41,25)

Vysvetlivky: CI – interval spoľahlivosti



Obr. 1 Citlivosť kašľového reflexu u zdravých nefajčiarov a zdravých fajčiarov – C2 hodnota



Obr. 2 Citlivosť kašľového reflexu u zdravých nefajčiarov a zdravých fajčiarov – C5 hodnota

Plúcne funkcie zisťované pred a po vyšetrení CKR boli nezmenené u fajčiarov aj nefajčiarov. Hodnoty FEV₁/FVC boli v norme a dosahovali viac ako 80% náležitej hodnoty a FEV₁ viac ako 80% náležitej hodnoty. Po aplikácii pripravených roztokov kapsaicínu popisovali účastníci najčastejšie subjektívne

nepríjemné pocity v hrdle (88,5% malo pocit šteklenia, pálenia až škriabania) a zriedkavejšie v oblasti za hrudnou kosťou (7,7% malo pocit pálenia až škriabania). Tieto subjektívne pocity pretrvávali iba niekoľko sekúnd po inhalácii aerosólu kapsaicínu a vymizli spontánne v priebehu niekoľkých minút od ukončenia aplikácie tusigénnej látky. Žiadne neočakávané nežiaduce reakcie sa nevyskytli. Počas vyšetrenia sme randomizovane aplikovali aj fyziologický roztok, pričom ani jeden z účastníkov nekašľal po vdýchnutí aerosólu fyziologického roztoku.

Diskusia

Naším cieľom bolo zistiť vplyv fajčenia na kašľový reflex. Pomocou štandardizovanej metodiky vyšetovania CKR vypracovanej Európskou respirologickou spoločnosťou sme porovnali, aká je prahová hodnota kapsaicínu na vyvolanie kašľa u zdravých dospelých fajčiarov a nefajčiarov. Zistili sme, že v skupine fajčiarov boli prahové koncentrácie kapsaicínu vyvolávajúce C2 aj C5 nižšie ako v kontrolnej skupine nefajčiarov, avšak zistené rozdiely neboli štatisticky významné ($P = 0,83$ a $P = 0,14$ v tomto poradí). U fajčiarov prahová koncentrácia kapsaicínu na dosiahnutie najmenej dvoch zakašľaní bola $7,81 \mu\text{mol/l}$ a prahová koncentrácia na dosiahnutie aspoň piatich zakašľaní bola $16,41 \mu\text{mol/l}$. V kontrolnej skupine zdravých dospelých nefajčiarov prahová koncentrácia kapsaicínu na dosiahnutie aspoň dvoch zakašľaní bola $8,71 \mu\text{mol/l}$ a prahová koncentrácia na dosiahnutie aspoň piatich zakašľaní bola $31,81 \mu\text{mol/l}$.

Vplyv fajčenia na CKR je v literatúre prezentovaná v rôznych štúdiách, avšak závery sa líšia a porovnať výsledky medzi jednotlivými štúdiami je zložité. Príčiny môžu vyplývať z viacerých dôvodov, najmä z dôvodu odlišných metodík použitých pri vyšetovaní alebo rozdielov v charakteristikách vyšetovaných jedincov. Blanc so spolupracovníkmi (2009) zistili zvýšenú CKR u asymptomatických fajčiarov v porovnaní s kontrolnou skupinou nefajčiarov, a to u mužov aj u žien bez ohľadu na vek. V hodnotách C2 medzi asymptomatickými fajčiarimi a zdravými nefajčiarimi neboli signifikantné rozdiely, ale signifikantne nižšie hodnoty C5 boli v skupine asymptomatických fajčiarov ($P < 0,05$). Autori predpokladali, že to môže súvisieť so stupňom zápalovej reakcie vyvolanej chronickou expozíciou cigaretového dymu (Blanc et al., 2009). Na druhej strane Dicpinigaitis (2003) zistil, že u fajčiarov bola CKR na kapsaicín znížená v porovnaní s kontrolnou skupinou nefajčiarov. Aj niektoré ďalšie štúdie zistili u zdravých fajčiarov zníženú CKR v porovnaní so zdravými nefajčiarimi (Millqvist and Bende, 2001; Kanazaki et al., 2012). Ukázalo sa však, že CKR je dynamický fenomén, ktorý je schopný reagovať okamžite a to v súvislosti so zmenami environmentálnych faktorov, ako je fajčenie, jeho prerušenie a opätovné pokračovanie. Sitkauskienė so spolupracovníkmi (2007) zistili, že CKR sa dva týždne po prerušení fajčenia signifikantne zvýšila. Dva až tri týždne po opätovnom začatí fajčenia (po predchádzajúcom období prerušenia) sa CKR vrátila skoro presne k pôvodným hodnotám (Sitkauskienė et al., 2007). Dokonca aj u dlhoročných fajčiarov sa citlivosť kašľa zvyšuje už dva týždne

po ukončení fajčenia, čo naznačuje, že kašľový reflex zostáva neporušený aj u fajčiarov s niekoľkoročnou anamnézou fajčenia (Dicpinigaitis et al., 2006). Mechanizmus, prečo je CKR u fajčiarov znížená, však nebol doteraz celkom objasnený, aj keď je navrhovaných niekoľko predpokladov, ktoré sa tento nález snažia objasniť. Pravdepodobne dlhodobá expozícia tabakovému dymu desenzibilizuje kašľové receptory nachádzajúce sa v epiteli dýchacích ciest. To by mohlo vysvetľovať aj pozorovanie, že kašeľ sa často prechodne zosilní po prerušení alebo ukončení fajčenia. Dlhodobá expozícia cigaretovému dymu môže spôsobovať aj zmeny v charaktere hlienu, čo môže tiež hrať úlohu v modulovaní CKR. Zloženie hlienu u fajčiarov je kvalitatívne aj kvantitatívne odlišné od zloženia hlienu u nefajčiarov. Zvýšený je objem hlienu aj mukociliárny klírens. Zvýšené množstvo hlienu môže poskytnúť ochrannú bariéru kašľovým receptorom v dýchacích cestách pred pôsobením tusigénnych podnetov. Znížená CKR u fajčiarov môže vysvetľovať aj nikotínom indukovaná inhibícia C-vláken alebo deplécia neuropeptidov (Dicpinigaitis, 2003). Závěry štúdie Blanc a spol. boli odlišné od záverov štúdie Dicpinigaitis, čo mohlo mať viacero dôvodov. V obidvoch prípadoch boli použité odlišné metodiky inhalačného kapsaicínového kašľového testu a rozdiely boli aj v skupinách fajčiarov, priemernom počte balení cigariet, ktoré fajčiari spotrebovali za rok. Uvažuje sa aj o možnosti, že v iniciálnej fáze je u fajčiarov najskôr znížená CKR a nasledovaná je zvýšením pri dlhodobom fajčení (Dicpinigaitis and Sitkauskienė, 2009).

Vyšetrovanie CKR štandardizovanou metodikou umožní jednoduchšie porovnanie získaných výsledkov medzi rôznymi laboratóriami. V našej klinicko-fyziologickej štúdii sme zistili, že citlivosť kašľového reflexu je zvýšená u fajčiarov (predovšetkým C5 parameter), avšak bez významných štatistických rozdielov v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých nefajčiarov. Štúdia si do budúcnosti vyžaduje ďalšie rozšírenie súborov zdravých dospelých fajčiarov aj nefajčiarov.

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0024/23.

Použitá literatúra

Agrawal S. Harm from tobacco: a common thread. *Thorax*. 2024;79(11):1000–1.

Belvisi MG, Birrell MA, Khalid S, et al. Neurophenotypes in airway diseases: insights from translational cough studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:1364–72.

Blanc FX, Macedo P, Hew M, et al. Capsaicin cough sensitivity in smokers with and without airflow obstruction. *Respir Med*. 2009;103(5):786–90.

Chamberlain SA, Garrod R, Douiri A, et al. The impact of chronic cough: a cross-sectional European survey. *Lung*. 2015;193:401–8.

Dicpinigaitis PV. Cough reflex sensitivity in cigarette smokers. *Chest*. 2003;123:685–8.

Dicpinigaitis PV, Sitkauskienė B. Letter to editor regarding Blanc et al. "Capsaicin cough sensitivity in

smokers with and without airflow obstruction". *Respir Med.* 2009;103(8):1242–3.

Dicpinigaitis PV, Sitkauskiene B, Stravinskaite K, et al. Effect of smoking cessation on cough reflex sensitivity. *Eur Respir J.* 2006;28(4):786–90.

Kanezaki M, Ebihara S, Gui P, et al. Effect of cigarette smoking on cough reflex induced by TRPV1 and TRPA1 stimulations. *Respir Med.* 2012;106(3):406–12.

Klein LW . Pathophysiologic Mechanisms of Tobacco Smoke Producing Atherosclerosis. *Curr Cardiol Rev* 2022;18:e110422203389.

Ma Y, Li MD . Establishment of a Strong Link Between Smoking and Cancer Pathogenesis through DNA Methylation Analysis. *Sci Rep* 2017;7:1811.

Millqvist E, Bende M. Capsaicin cough sensitivity is decreased in smokers. *Respir Med.* 2001;95:19–21.

Morice AH, Fontana GA, Belvisi MG, et al. ERS guidelines on the assessment of cough. *Eur Respir J.* 2007;29:1256–76.

Morice AH, Millqvist E, Bieksiene K, et al. ERS guidelines on the diagnosis and treatment of chronic cough in adults and children. *Eur Respir J.* 2020;55:1901136.

Sitkauskiene B, Stravinskaite K, Sakalauskas R, et al. Changes in cough reflex sensitivity after cessation and resumption of cigarette smoking. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(3):240–3.

Výskyt a morfológické charakteristiky tuberculum Zuckerkandli štítnej žľazy: kadaverická štúdia

Samec I.¹, Samec M.², Hešková G.¹, Hurta Csizmár, S.¹, Péč M.², Mazuchová J.²,
Výbohová D.¹, Franecková, M.²

¹ Ústav anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

² Ústav lekárskej biológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Korešpondujúci autor: Samec Iryna, zavhorodnia1@uniba.sk

Abstrakt

Tuberculum Zuckerkandli (TZ) je anatomická štruktúra, pochádzajúca z ultimobranchiálneho telieska (UBT), ktoré pri neúplnej integrácii do laloku štítnej žľazy (ŠŽ) vytvára rozpoznateľnú projekciu (predĺženie) dorzálnej časti laloku. TZ leží v tesnej syntopii s n.laryngeus recurrens (NLR), čím slúži ako orientačný bod pre jeho identifikáciu a prezerváciu voči iatrogénnym poškodeniam. Predkladaná prospektívna kadaverická štúdia sa zameriava na sledovanie výskytu TZ a jeho morfológických variácií na 12 lalokoch u 6 formalínom fixovaných kadaverov (5 mužov a 1 žena). TZ bol pozorovaný na 75 % lalokoch a častejšie sa vyskytoval na pravej strane (41.67 %). Najfrekvencovanejšie sme zaznamenali Grade-2 TZ (41.67 % lalokov). Grade-1 a Grade-3 TZ sme pozorovali menej často. Na polovici lalokov bolo určené dorzálne umiestnenie apexu TZ. Vedomosti z danej štúdie môžu byť aplikované počas chirurgických zákrokov na krku, sú dôležité pre ich úspešný priebeh a minimalizáciu poškodenia NRL a tým pádom aj vyvolania pooperačných komplikácií spojených s rečou a dýchaním.

Kľúčové slová: Anatomické variácie, štítna žľaza, tuberculum Zuckerkandli, nervus laryngeus recurrens, chirurgia hlavy a krku.

Úvod

Tuberculum Zuckerkandli (TZ) je anatomická štruktúra, definovaná ako dorzálna projekcia laloku štítnej žľazy (ŠŽ). V 4. týždni tehotenstva sa primordium ŠŽ začína vytvárať zo stredného endodermálneho zhrubnutia v spodine primordiálneho hltana oblasti tuberculum impar (medzi prvým a druhým faryngeálnym vakom), ktoré invagínuje do priľahlej mezodermy. Primordium zostupuje od úrovne foramen caecum (s ktorým je dočasne spojený prostredníctvom ductus thyreoglossus, pokiaľ ductus thyreoglossus neobliteruje okolo 6.týždňa tehotenstva), pokračuje kaudálnym smerom ventrálne od os hyoideum, cartilagine laryngis, trachea a dostáva sa na úroveň stavcov TV až C1. Počas jeho zostupu sa vytvárajú dva laterálne laloky spojené prostredníctvom

isthmus. V 7.-8. týždni tehotenstva už má ŠŽ svoj definitívny tvar a umiestnenie (Mansberger and Wei, 1993). V priebehu 5. týždňa tehotenstva v oblasti štvrtého/piateho faryngeálneho vaku sa taktiež formujú párne primordia ultimobranchiálnych teliesok (UBT), obsahujúce parafolikulárne C-bunky, ktoré pochádzajú z neuroektodermy, a epiteliálne bunky, ktoré majú endodermálny pôvod. Neskôršie, pár UBT zostupuje kaudálne smerom k vyvíjajúcej sa ŠŽ a následne sa spájajú s laterálnymi lalokmi ŠŽ, migrujú do jej tkaniva ako parafolikulárne C-bunky (väčšinou sa koncentrujú v laterálnych častiach žľazy) a usadzujú sa najmä v medzifolikulárnych priestoroch aby produkovali kalcitonín (Mérida-Velasco et al., 1989). V niektorých prípadoch sa však časť ultimobranchiálneho tkaniva úplne neintegruje do ŠŽ, čo vedie k vytvoreniu hrboľčiek (tzv. projekcií) pozdĺž dorzálnej časti lalokov ŠŽ (Gauger et al., 2001). Z toho dôvodu sa zvyšky UBT, ktoré ostali v dôsledku neúplného splynutia UBT so ŠŽ, považuje za tuberculum Zuckerkandli (TZ) (Gauger et al., 2001).

TZ sa vyskytuje na 84 % lalokov na základe výsledkov predchádzajúcich kadaverických štúdií a na 69 % lalokov podľa získaných dát z chirurgických štúdií (Viveka, 2018). Táto štruktúra často zasahuje do tracheoezofageálneho žliabku, čo môže spôsobiť nekompletné odstránenie štítného tkaniva počas tyreoidektómii. TZ ponechaný in situ môže mať za následok pretrvávanie symptómov alebo výskyt recidívy ochorenia, ako aj zvýšenú absorpciu rádioaktívneho jódu počas liečby (Sheahan and Murphy, 2011).

Okrem toho TZ sa považuje za jeden z orientačných bodov pre vizualizáciu nervus laryngeus recurrens (NLR), ktorý má tesný syntopický vzťah k TZ. NLR je často objektom iatrogénneho poškodenia a pooperačných komplikácií počas chirurgických zákrokov na krku kvôli svojmu hlbokému anatomickému uloženiu a veľkej variabilite umiestnenia a priebehu. Unilaterálne alebo bilaterálne poškodenie NLR môže spôsobiť pooperačný chrapot, obštrukciu dýchacích ciest, dýchavičnosť, paralýzu hlasiviek, a niekedy môže viesť až k fatálnym stavom (Sharp et al., 2021). Predchádzajúce štúdie uvádzajú výskyt prechodného ochrnutia NLR v rozmedzí od 0 % do 7,1 % prípadov a trvalého ochrnutia NLR v 0 %–11 % prípadov (Dralle et al., 2008). Z toho dôvodu vyplýva, že je enormne dôležité správne vizualizovať a ochrániť túto nervovú štruktúru. Cieľom danej kadaverickej štúdie je sledovať výskyt TZ. Okrem toho sa predkladaná štúdia sa zameriava na popis rôznych morfológických charakteristík TZ ako sú typ, rozmery a umiestnenie TZ.

Materiál a metódy

Prospektívna kadaverická štúdia prebiehala na Ústave anatómie Jesseniovej Lekárskej Fakulty v Martine Univerzity Komenského v Bratislave. Boli použité štandardné anatomické pitevné nástroje. Pre lepší prístup k malým anatomickým štruktúram a lepšie osvetlenie poľa boli použité chirurgické lupy s 3,5-násobným zväčšením a LED svetlom. Do štúdie bolo zahrnutých 12 strán (6 pravých a 6 ľavých) u 6 formalínom fixovaných kadaverov (5 mužov a 1 žena) bez ohľadu na vek

a pohlavie. Inkluzívne kritéria zahŕňali: a) nepoškodené ŠŽ, b) nepoškodené anatomické štruktúry v syntopii so ŠŽ, c) ŠŽ bez patologických zmien.

Na prístup k ŠŽ bol použitý štandardný postup anatomickej pitvy krku. Dva kožné rezy boli urobené v mediolaterálnom smere od linea mediana anterior a) pozdĺž basis mandibulae, b) pozdĺž clavicula. Jeden kožný rez v kaudálnom smere od protuberancia mentalis do incisura jugularis sterni. Odpreparovaná koža bola odklopená laterálne. Platysma bola odklopená kraniálne. Sternálny odstup m. sternocleidomastoideus na manubrium sterni bol pretnutý a odklopený laterálne aby umožnil lepší prístup k ŠŽ. Pre detailne hodnotenie ŠŽ a jej morfológie, topografické útvary na regio cervicalis anterior (anatomické štruktúry v trigonum caroticum a trigonum musculare (mm.infrahyoidei boli odklopené kraniálne)) a regio cervicalis lateralis (anatomické štruktúry v trigonum omotrapium a trigonum omoclaviculare) boli vypitvané. Sternálny okraj klavikuly bol vyklbený a odklopený pre jednoduchší prístup detailnej pitvy ŠŽ. TZ bol hodnotený najmä z laterálneho pohľadu, pričom všetky okolité anatomické štruktúry boli odtiahnuté od ŠŽ aby sa umožnilo čo najpresnejšie hodnotenie margo posterior gl.thyroideae (MPGT) a TZ.

V našej štúdii sme hodnotili a) výskyt TZ, b) typ TZ, c) umiestnenie TZ, d) rozmery TZ. TZ boli rozdelené a hodnotené podľa klasifikácii Pelizzo do štyroch kategórií (Grade-0 až Grade-3), Tab.1 (Pelizzo et al., 1998). Výskyt a typ TZ sme hodnotili na základe kategórií, uvedených v Tabulke 1. Výskyt TZ bol hodnotený na základe kvalitatívnej definície, čo zodpovedá prítomnosti TZ ak TZ je zaradený do kategórie Gade-1 až Grade-3 a absencie TZ v skupine Grade-0. Typ TZ bol zvolený na základe kvantitatívnej definície (definuje dĺžku priečnej osi TZ - dĺžky od MPGT k apexu TZ).

Tabuľka 1. Hodnotenie výskytu a typu TZ

Kategória	Kvantitatívna definícia	Kvalitatívna definícia
Grade-0	TZ absentuje	MPGT bez zjavných hrbolčiek
Grade-1	< 5 mm	Malý identifikovateľný hrbolček na MPGT
Grade-2	od 5 mm do 10 mm	Ľahko pozorovateľný výrastok na MPGT
Grade-3	> 10 mm	Ľahko pozorovateľný výrastok na MPGT

Legenda

TZ - tuberculum Zuckerkandli, MPGT – margo posterior gl.thyreoideae

Umiestnenie TZ popisuje polohu apexu TZ (najvzdialenejší bod od MPGT na priečnej osi) vzhľadom na laloky ŠŽ: a) dorzolaterálne, b) dorzálne, c) dorzomediálne, d) retroezofageálne. Umiestnenie TZ sme zaznamenali iba u TZ typu Grade-2 a Grade-3, pretože TZ z kategórie Grade-1 je krátky na presnú definíciu polohy apexu TZ.

Rozmery TZ boli namerané kovovým pravítkom a zaznamenané v milimetroch. Merali sme priečnu os TZ a pozdĺžnu os TZ. Priečna os TZ je definovaná ako výška TZ nameraná laterálnym smerom od MPGT k najvzdialenejšiemu bodu TZ – apexu TZ. Pozdĺžna os je definovaná ako kraniokaudálna dĺžka TZ v najširšom mieste TZ pozdĺž MPGT.

Výsledky

V našej štúdii sme sa zameriavali na sledovanie výskytu TZ v ŠŽ. Na základe klasifikácie Pelizzo sme hodnotili typy TZ Grade-1 až Grade-3 za prítomnú anatomickú štruktúru a Grade-0 ako absentujúcu štruktúru (Pelizzo et al., 1998). Na niektorých stranách sme pozorovali dva hrbolčeky, pripomínajúce TZ rovnakých alebo rozličných kategórií (Grade-ov). V takom prípade sme TZ na danom laloku považovali za bilobárny. Každý z dvoch hrbolčekov TZ bol nameraný a priradený do určitej kategórie Grade-1 až Grade-3. Vyšší Grade bol priradený aby reprezentoval TZ na danej strane (napr. ak sme na jednej strane identifikovali bilobárny TZ, pozostávajúci z dvoch hrbolčekov s kategóriami Grade-2 a Grade-3, potom celú stranu reprezentoval hrbolček s vyšším Grade-om, v danom prípade Grade-3). Taktiež sme na jednej strane pozorovali jeden TZ s dvoma apexmi, ktorý sme zhodnotili ako unilobárny TZ s dvoma apexmi.

Výskyt TZ udávaný na celkový počet strán bol 75 % (9/12 strán). V danej štúdii sme pozorovali výskyt TZ u 5 mužov (10 lalokov) a 1 ženy (2 laloky). Vzhľadom na pohlavie sa TZ vyskytoval častejšie u žien (na 2 z 2 lalokov), ako u mužov (7 z 10 lalokov). Žiadna štatistická signifikancia (Fisherov exaktný test) nebola zistená vo výskyte TZ medzi pohlaviami.

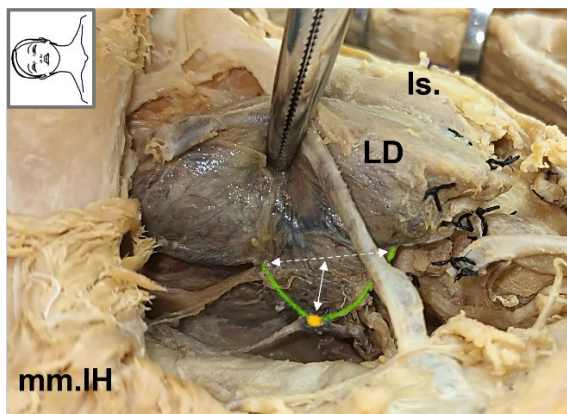
Tabuľka 2. Typy TZ a ich rozmery

	Pravá strana	Ľavá strana	Pravá strana	Ľavá strana
Kadaver 1	Grade-0	Grade-1	absentuje	< 5 mm
Kadaver 2	Grade-2	Grade-2	7 x 16 mm	7.5 x 23 mm 9.5
Kadaver 3	Grade-2	Grade-2	6 x 12 mm	6 x 9 mm
Kadaver 4	Grade-2 Grade-2	Grade-1	7 x 21 mm 8 x 1 mm	< 5 mm
Kadaver 5	Grade-2 Grade-3	Grade-0	9 x 18 mm 12 x 12 mm	absentuje
Kadaver 6	Grade-1	Grade-0	< 5 mm	absentuje

Legenda

absentuje – v danej štúdii predpokladá TZ Grade-0.

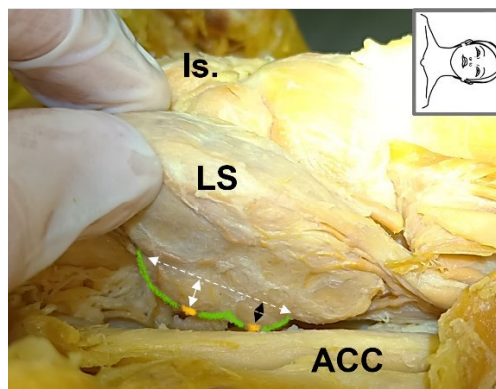
V priebehu pitiev sme zistili, že TZ má prevalenciu na pravej strane, kde sa vyskytuje na 41.67 % lalokov. Na ľavej strane TZ boli pozorované menej často, na 33.3 % lalokov. V rámci jednej ŠŽ (súčasne na pravom a ľavom laloku) sme TZ zaznamenali u 50 % kadaverov. V prípade zvyšnej polovice kadaverov sme TZ pozorovali len na jednej strane. V žiadnom kadaveri nebola zaznamenaná absencia TZ na oboch lalokoch súčasne (0 %).



Obrázok 1. Laterálny pohľad, pravá strana. Unilobárny TZ s jedným apexom. Grade-2. Prierečna os 6 mm, pozdĺžna os 12 mm. TZ umiestnený dorzálny.

Legenda

Is. – isthmus, LD – lobus dexter, mm.IH – mm.infrahyoidei, žltá farba – apex TZ, zelená farba – okraj TZ, biela prerušovaná šípka – pozdĺžna os TZ (PoO veľkosť), biela neprerušovaná šípka – prierečna os TZ (PrO veľkosť).



Obrázok 2. Laterálny pohľad, ľavá strana. Unilobárny TZ s dvoma apexmi. Grade-2. Prierečna os kraniálna 7.5 mm, prierečna os kaudálna 9.5 mm, pozdĺžna os 23 mm. TZ umiestnený dorzálny.

Legenda

Is. – isthmus, LS – lobus sinister, ACC – a.carotis communis, žltá farba – apexy TZ, zelená farba – okraje TZ, biela prerušovaná šípka – pozdĺžna os TZ (PoO veľkosť), čierna neprerušovaná šípka – prierečna os horného hrbolčeka unilobárneho TZ (PrO veľkosť), biela neprerušovaná šípka – prierečna os dolného hrbolčeka unilobárneho TZ (PrO veľkosť).

Podľa tabuľky 2 môžeme sumarizovať, že kategórie Grade-0 a Grade-1 sa každá z nich vyskytovala na 25 % lalokov. TZ typ Grade-2 sme pozorovali najčastejšie – na 41.7 % lalokoch, Obr.1. Najzriedkavejší typ TZ – Grade-3 sa vyskytoval na 8.3 % lalokoch, Obr. 3C. Na pravej strane sa najčastejšie vyskytoval TZ typ Grade-2 – na 50 % lalokoch, Obr.1. Iné typy TZ (Grade-0, Grade-1, Grade-3) sa vyskytovali s

rovnakou frekvenciou – na 16.7 % lalokoch. Na ľavej strane sme nezaznamenali žiadny prípad TZ s typom Grade-3. Grade-0 až Grade-2 mali každý rovnaký výskyt na ľavej strane – na 33 % lalokov. Počas pitiev sme zaznamenali 2 kadavery (33.3 % kadaverov), ktoré mali TZ rovnakého typu z pravej (Grade-2) a ľavej strany (Grade-2), Tab. 2. Zvyšné dve tretiny kadaverov mali odlišné typy TZ z každej strany. Tabuľka 2 predstavuje veľkosť každého TZ nameraného počas pitiev v tvári PrV x PoV, kde PrV je priečna veľkosť TZ uvedená v milimetroch, PoV je pozdĺžna veľkosť TZ uvedená v milimetroch. Na základe tabuľky 2 sme porovnali veľkosť priečnej osi TZ v pároch a zistili sme, že veľkosť TZ na pravej strane prevláda nad veľkosťou TZ na ľavej strane u polovici kadaverov. V 33.3 % prípadoch priečna veľkosť TZ na ľavej strane bola väčšia ako na pravej strane. Len v jednom prípade (16.7 %) veľkosť priečnej osi TZ na pravej a na ľavej strane boli rovnaké.

Tabuľka 3. Poloha TZ (smer apexu TZ)

	Pravá strana	Ľavá strana
Kadaver 1	absentuje	N/I
Kadaver 2	retroezofageálne	dorzálne
Kadaver 3	dorzálne	dorzomediálne
Kadaver 4	dorzálne dorzálne	N/I
Kadaver 5	dorzálne dorzomediálne	absentuje
Kadaver 6	N/I	absentuje

Legenda

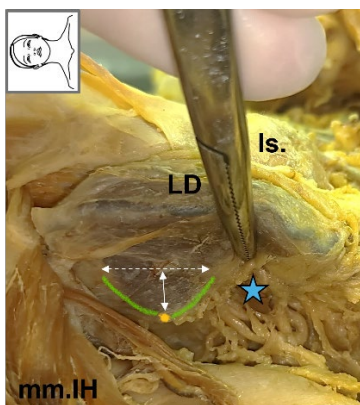
absentuje – TZ Grade-0, N/I – neidentifikovateľné umiestnenie TZ (všetky TZ Grade-1)

Určili sme umiestnenie TZ a smer jeho apexu v polovici celkového počtu strán: na 4 pravých a 2 ľavých stranách, Tab. 3. Na ostatných stranách sa nedalo určiť presne umiestnenie TZ z dôvodu nízkej kategórie TZ (Grade-0 a Grade-1). V 50 % strán sa vyskytovala dorzálne umiestnenie TZ, Obr.1,2. V 33.3 % prípadov sme pozorovali dorzomediálne postavenie TZ, smerujúce k žliabku medzi tracheou a ezofágom (tracheoezofageálny žliabok), Obr.3C. Retroezofageálny TZ bol zaznamenaný v 1 prípade (16.7 %). Na žiadnej strane sme neidentifikovali dorzolaterálne umiestnenie TZ (0 %).

V našej štúdii sme pozorovali TZ atypickej morfológie na troch stranách: a) na jednej strane sa nachádzal unilobárny TZ s dvoma apexmi, b) na dvoch stranách boli prítomné bilobárne TZ s hrbolčekmi rovnakých alebo rôznych kategórií (Grade-1 až Grade-3).

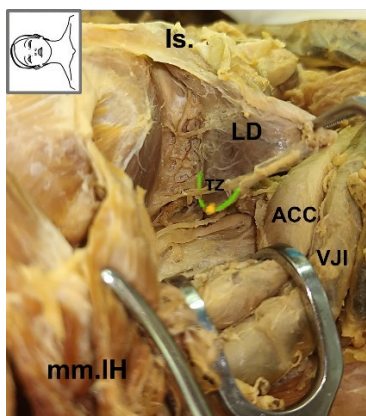
V jednom prípade sme pozorovali TZ na ľavej strane, ktorý pozostával z kraniálneho a kaudálneho hrbolčeka, Obr.2. Taký TZ bol považovaný za unilobárny TZ z dôvodu prítomnosti spojenia medzi dvoma hrbolčekmi (okraj TZ skôr pripomínal vlnu). Pričná dĺžka takého unilobárneho TZ k jeho kraniálnemu apexu siahala do dĺžky 7.5 mm. Kaudálny apex TZ sa nachádzal vo vzdialenosti 9.5 mm od MPGT. Pozdĺžna výška celého TZ siahala do dĺžky 23 mm. Celý TZ smeroval dorzálne.

Počas pitvy pravej strany jedného kadavera sme zaznamenali dva samostatne nespojené hrbolčeky – dva TZ, pričom obidva zodpovedali kategórii Grade-2. Taký TZ bol považovaný za bilobárny TZ s dvoma nespojenými hrbolčekmi. Kraniálny hrbolček mal rozmer 7 x 21 mm, kaudálny – 8 x 10 mm. Apexy obidvoch hrbolčekov smerovali dorzálne.



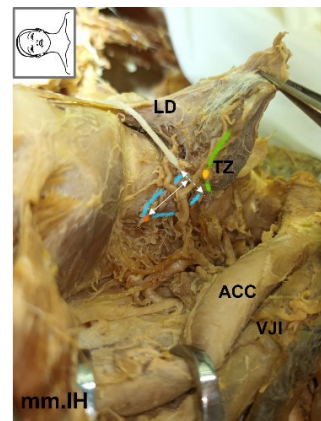
Obrázok 3A. Laterálny pohľad, pravá strana.

Bilobárny TZ s dvoma nespojenými hrbolčekmi. Grade-2 kraniálny hrbolček (žltá a zelena farba). Pričná os 9 mm, pozdĺžna os 18 mm. TZ umiestnený dorzálne. Modrá hviezda ukazuje miesto umiestnenie kaudálneho hrbolčeka, ktorý je prekrytý inými anatomickými štruktúrami.



Obrázok 3B. Kraniálny pohľad, pravá strana.

Bilobárny TZ s dvoma nespojenými hrbolčekmi. Laterálny lalok ŠŽ a TZ (žltá a zelena farba) sú odklopené kaudálnym smerom. Vidíme mediálnu plochu ŠŽ. Kaudálny hrbolček je prekrytý anatomickými štruktúrami.



Obrázok 3C. Kraniálny pohľad, pravá strana.

Bilobárny TZ s dvoma jednotlivými nespojenými hrbolčekmi. Vidíme mediálnu plochu ŠŽ. Grade-3 kaudálny hrbolček (oranžová a modrá farba). Pričná os 12 mm, pozdĺžna os 12 mm. Hrbolček umiestnený dorzomediálne v žliabku medzi tracheou a ezofágom. Kraniálny hrbolček (žltá a zelena farba) je odklopený do strany aby ukázať smer apexu kaudálneho hrbolčeka.

Legenda

Is. – isthmus, LD – lobus dexter, LS – lobus sinister, mm.IH – mm.infrahyoidei, TZ – tuberculum Zuckerkandli, ACC – a.carotis communis, VJI – v.jugularis interna, žltá farba – apex kraniálneho TZ, zelená farba – okraj kraniálneho TZ, biela prerušovaná šípka – pozdĺžna os TZ (PoO veľkosť), biela neprerušovaná šípka – priečna os TZ (PrO veľkosť), modrá hviezda – nevypitvaný kaudálny TZ, oranžová farba – apex kaudálneho TZ, modrá farba – okraj kaudálneho TZ.

Podobnú morfológickú variáciu ako bilobárny TZ s dvoma hrbolčekmi sme našli u iného kadavera na pravej strane, kde sme tiež pozorovali dva nezávisle nespojené hrbolčeky, ktoré sme priradili k dvom rôznym kategóriám na základe nameraných rozmerov, Obr. 3A-C. Kraniálny hrbolček zodpovedal kategórii Grade-2 a meral 9 x 18 mm, Obr.3A. Apex smeroval dorzálny. Kaudálny hrbolček bol priradený ku kategórii Grade-3 z dôvodu dĺžky priečnej osi, ktorá presahovala 10 mm, Obr.3C. Kaudálny hrbolček meral 12 x 12 mm, jeho apex smeroval dorzomediálne a ležal v žliabku medzi tracheou a ezofágom.

Diskusia

V našej kadaverickej štúdii sme zistili výskyt TZ na 75 % lalokov. V iných kadaverických štúdiách bola daná anatomická štruktúra zaznamenaná v 68.75 % (Yalcin et al., 2009) a v 83 % lalokov (Won et al., 2017). Pre porovnanie, niektoré chirurgické štúdie tiež referovali podobnú frekvenciu výskytu TZ: 63 % (Gauger et al., 2001), 76.92 % (Pelizzo et al., 1998), 79.38 % (Rajapaksha et al., 2015), 79.48 % (Gil-Carcedo Sañudo et al., 2012). Z iného pohľadu jedná chirurgická štúdia zaznamenala TZ len na 7 % lalokoch (Page et al., 2009). V inej CT štúdii bol identifikovaný TZ na 81.34 % lalokov (Lee et al., 2012). Prehľadová štúdia po analýze šiestich kadaverických štúdií popísala výskyt TZ v rozsahu 59 % až 100 % s priemernou prevalenciou 84 %, kým priemerný výskyt TZ v devätnástich chirurgických štúdiách dosahoval frekvenciu 69 %. Po sumarizácii všetkých štúdií (26 štúdií, 4271 lalokov) predstavoval priemer výskytu TZ 76.5 % (Viveka, 2018).

Kadaverická štúdia, ktorá zahŕňala 50 kadaverov s pomerom muži : ženy = 2 : 3, identifikovala častejší výskyt TZ u žien (49 % lalokov) ako u mužov (34 % lalokov) (Won et al., 2017). V našej štúdii sme tiež potvrdili frekventovanejší výskyt TZ na lalokoch ŠŽ u žien ako u mužov (bez štatistickej signifikancie), ale z dôvodu nerovnomerného pomeru kadaverov vzhľadom na pohlavie (muži : ženy = 5:1) a menšieho súboru kadaverov (n = 6). Výsledok je možné ešte spresniť zvýšením celkového počtu kadaverov a vyrovnaním pomeru pohlavia. Na druhej strane, ďalšia kadaverická štúdia s väčším súborom tiež nepotvrdila žiadnu štatistickú signifikanciu vo výskyte TZ medzi pohlaviami (Yalcin et al., 2009).

Po analýze výsledkov z pitiev v našej štúdii sme zaznamenali prevalentný výskyt TZ na pravej strane (41.67 %) v porovnaní s ľavou stranou (33.3 %). Bilaterálne TZ sme pozorovali u 50 % kadaverov.

Väčšina predchádzajúcich štúdií (vrátane kadaverických, chirurgických a CT) tiež referovala častejší výskyt TZ na pravej strane ako na ľavej strane (Lee et al., 2012; Pelizzo et al., 1998; Sheahan and Murphy, 2011; Won et al., 2017). V štúdií Mehanna a kol. tiež zaznamenali častejší výskyt TZ na pravej strane (72.6 %) ako na ľavej strane (53.9 %). Okrem toho v spomenutej štúdií bola preukázaná aj štatistická signifikancia vo výskyte TZ vzhľadom na jeho umiestnenie, $p = 0.003$ (Mehanna et al., 2014). Iná chirurgická štúdia detegovala 84.84 % pravostranných TZ a 73.95 % ľavostranných TZ. Bilaterálne TZ sa vyskytoval u 23.8 % kadaverov (Gil-Carcedo Sañudo et al., 2012). V porovnaní s poslednou spomenutou štúdiou, iná chirurgická štúdia preukázala podobný výskyt TZ na pravej aj na ľavej strane (88 % a 71 %, resp.), ale zaznamenala vyššiu frekvenciu výskytu TZ bilaterálne (69 %). Okrem toho, autori štúdie zistili, že TZ absentoval na oboch stranách u 10 % pacientov. Z iného hľadiska v ďalšej anatomickej štúdií bola zaznamenaná opačná tendencia výskytu TZ: daná anatomická štruktúra sa vyskytovala častejšie na ľavej strane (53.75 %) ako na pravej strane (46.25 %) (Yalcin et al., 2009).

Na základe originálnej klasifikácie Pelizzo (Pelizzo et al., 1998), ktorá bola použitá v našej štúdií, sme zistili častejší výskyt TZ Grade-2 (41.7 % lalokov), v porovnaní s Grade-1 (25 % lalokov) a Grade-3 (8.3 % lalokov). TZ neboli zaznamenané (absentovali) na 25 % lalokov. Podobná tendencia výsledkov bola popísaná v anatomickej štúdií Yalcin a kol., v ktorej bol TZ kategórie Grade-2 pozorovaný najčastejšie (56.25 % lalokov) v porovnaní s ostatnými typmi TZ (v zostupnom poradí): Grade-1 (20 % lalokov), Grade-3 (12.5 % lalokov), Grade-0 (11.25 % lalokov) (Yalcin et al., 2009). Ďalšia chirurgická štúdia tiež potvrdila častejšiu tendenciu výskytu Grade-2 TZ (53.85 % lalokov), aj keď ostatné kategórie TZ mali odlišnú prevalenciu výskytu (v zostupnom poradí): Grade-0 (23.08 % lalokov), Grade-3 (14.42 % lalokov), Grade-1 (8.65 % lalokov) (Pelizzo et al., 1998). Z iného hľadiska, v ďalšia chirurgickej štúdií Rajapaksha a kol. popísali častejší výskyt Grade-1 TZ (36.25 % lalokov) v porovnaní s Grade-2 (30.63 % lalokov) a Grade-3 (12.5 % lalokov). TZ absentoval v 20.63 % lalokov (Rajapaksha et al., 2015). Frekventovaný výskyt Grade-2 TZ (37 % lalokov) sa tiež potvrdil v štúdií Sheahan a kol., v ktorej bola predstavená modifikovaná kategória TZ Grade-0/1 (popísaná ako nerozpoznatelný/absentujúci TZ) s výskytom u 29 % lalokov. Grade-3 TZ pozorovali v 24 % lalokov. V 9 % lalokov sa nedalo zhodnotiť kategóriu TZ (Sheahan and Murphy, 2011).

Počas hodnotenia umiestnenia TZ a jeho apexu sme uvažovali nad polohou apexu vzhľadom na lalok ŠŽ z ventrálneho pohľadu na krk, resp. ŠŽ. Hodnotili sme TZ len z kategórií Grade-2 a Grade-3. Polovica apexov TZ smerovala dorzálna, približne 33.33 % apexov TZ siahali do tracheoezofageálneho žliabku. Najmenej často sme sa stretli s retroezofageálne uloženým apexom TZ (16.67 %). Pre porovnanie, chirurgická štúdia Gauger a kol. stanovila najčastejší výskyt laterálne uloženého TZ a jeho apexu (61.9 %). Dorzomediálny smer apexu siahajúci k tracheoezofageálnemu žliabku sa vyskytoval na 26.98 % lalokov. Dorzálny a retroezofageálny smer apexu TZ boli zaznamenané menej často (6.35 % a 4.76 %, resp.) (Gauger et al., 2001). V inej chirurgickej štúdií bola popísaná najväčšia

frekvencia polohy apexu v tracheoezofageálnom smere (70.32 % TZ), kým retroezofageálne uloženie apexu TZ bolo pozorované len niekoľko krát (Gil-Carcedo Sañudo et al., 2012). V niektorých ďalších štúdiách sa hodnotilo uloženie TZ a jeho apexu z inej perspektívy: a) dorzomediálne, b) dorzomediálne kraniálne, c) dorzomediálne kaudálne (Gil-Carcedo Sañudo et al., 2012; Won et al., 2017).

V našej štúdii sme neanalyzovali priemery priečnej a pozdĺžnej osi TZ, ani neuvádzali rozsahy daných parametrov z dôvodu menšieho súboru, Tab.2. Chirurgická štúdia referuje priemer veľkosti TZ 9.3 mm (zodpovedá Grade-2) a rozsah veľkosti TZ 3 až 40 mm s mediánom 8 mm (Sheahan and Murphy, 2011). Vo výsledkoch inej štúdie bol definovaný priemer priečnej osi 11 mm (rozsah 8 – 31 mm) a pozdĺžnej osi 9 mm (rozsah 6 -27 mm) (Gil-Carcedo Sañudo et al., 2012). Ďalšia chirurgická štúdia Mehanna a kol. poskytla priemer veľkosti TZ jednotlivo pre každú stranu: priemerná veľkosť TZ z pravej strany siahala ku 11.2 mm, a z ľavej strany ku 7.5 mm. Okrem toho bolo zhodnotené, že TZ z pravej strany boli väčšie ako z ľavej strany u 61.72 % pacientov, menšie z pravej ako z ľavej strany u 14.06 % pacientov a rovnakú veľkosť mali u 24.22 % pacientov (Mehanna et al., 2014). V našej štúdii sme mali podobnú tendenciu prevalencie veľkosti pravých TZ nad ľavými TZ na základe klasifikácie Pelizzo (50 % kadaverov), ale u 33.3 % kadaverov sme zaznamenali rovnakú veľkosť pravého a ľavého TZ. Vo zvyšku lalokov bol ľavý TZ väčší ako pravý TZ.

V našej štúdii sme detegovali jeden prípad unilobárneho TZ s dvoma menšími apexmi a dva prípady s dvoma TZ na jednom laloku (tzv. bilobarne TZ). Výskyt bilobárneho TZ (4.7 %) bol spomenutý v chirurgickej štúdii, síce frekventovanejšie boli unilobárne TZ – viac ako 90 % (Mehanna et al., 2014). Odlišné výsledky medzi predkladanou štúdiou a predchádzajúcimi štúdiami môžu byť vysvetlené odlišnou metódou kalkulácie výskytu TZ (z celkového počtu lalokov, z celkového počtu TZ, z počtu TZ na pravej/ľavej strane a pod.) alebo priradenia TZ k určitej kategórii podľa klasifikácie Pelizzo (Pelizzo et al., 1998): v niektorých štúdiách boli kategórie TZ skombinované a tak sa hodnotili ako jeden typ TZ, napr. Grade-0/1 (Mehanna et al., 2014; Sheahan and Murphy, 2011), alebo Grade-0/1/2 (Gauger et al., 2001). Okrem toho odlišné alebo nerovnomerné pomery mužov a žien v súbore diskutovaných štúdií mohli ovplyvniť aj výsledky ako aj následnú štatistickú analýzu. Taktiež je dôležité aj zohľadnenie počtu vzoriek (kadaverov, pacientov, lalokov a pod.) v súbore.

Presnosť hodnotenia celkového výskytu TZ, ako aj jeho typu podľa klasifikácie Pelizzo mohla byť ovplyvnená aj technickým vybavením/osvetlením/používaním inštrumentov pri anatomických pitvách a chirurgických zákrokoch. Spomenuté podmienky a pomôcky mohli spresniť alebo skresliť hodnotenie prítomnosti TZ na lalokoch ŠŽ, ich typu a veľkosti, keďže hľadanie a identifikácia TZ v niektorých prípadoch vyžaduje precíznu prácu.

Záver

TZ je morfológicky variabilná štruktúra, ktorá je dôležitým chirurgickým orientačným bodom pre identifikáciu a zachovanie priebehu NLR počas operačných zákrokov. Na základe danej štúdie bolo zistené že TZ sa môže vyskytovať u každého jedinca aspoň z jednej strany. Celkový výskyt TZ prepočítaný na počet lalokov dosahuje 75 %. Najčastejšie sa vyskytuje z pravej strany. V našej štúdii boli pozorované možné anatomické variácie v morfológii TZ ako unilobárny TZ s jedným apexom (najfrekvencovanejší TZ), unilobárny TZ s dvoma apexmi (tvar TZ pripomínajúci vlnu) a bilobárne TZ (dva jednotlivé nespojené TZ na jednom laloku). Dané vedomosti môžu byť aplikované počas operačných zákrokov na krku a predstavujú dôležitý faktor pre ich úspešný priebeh spojený s minimálnym rizikom poškodenia NLR a vyvolania pooperačných komplikácií spojených s rečou a dýchaním.

Podakovanie

Ďakujeme darcom a ich rodinám za možnosť rozvoja výskumu v oblasti anatómii. Výsledky štúdie prispievajú k zvýšeniu presnosti hodnotenia anatomických štruktúr v operačnom poli počas chirurgických zákrokov na krku.

Použitá literatúra

- Dralle H, Sekulla C, Lorenz K, et al. Intraoperative Monitoring of the Recurrent Laryngeal Nerve in Thyroid Surgery. *World J Surg* 2008;32(7):1358–1366; doi: 10.1007/s00268-008-9483-2.
- Gauger PG, Delbridge LW, Thompson NW, et al. Incidence and Importance of the Tubercle of Zuckerkandl in Thyroid Surgery. *The European Journal of Surgery* 2001;167(4):249–254; doi: 10.1080/110241501300091363.
- Gil-Carcedo Sañudo E, Menéndez Argüelles ME, Vallejo Valdezate LÁ, et al. Zuckerkandl's Tubercle. Location, Shape and Dimensions. *Acta Otorrinolaringologica (English Edition)* 2012;63(6):443–449; doi: 10.1016/j.otoeng.2012.11.006.
- Lee TC, Selvarajan SK, Curtin H, et al. Zuckerkandl Tubercle of the Thyroid: A Common Imaging Finding That May Mimic Pathology. *American Journal of Neuroradiology* 2012;33(6):1134–1138; doi: 10.3174/ajnr.A2914.
- Mansberger AR and Wei JP. Surgical Embryology and Anatomy of the Thyroid and Parathyroid Glands. *Surgical Clinics of North America* 1993;73(4):727–746; doi: 10.1016/S0039-6109(16)46082-2.
- Mehanna R, Murphy MS and Sheahan P. Thyroid Tubercle of Zuckerkandl Is More Consistently Present and Larger on the Right: A Prospective Series. 2014; doi: 10.1159/000355823.

Mérida-Velasco JA, García-García JD, Espín-Ferra J, et al. Origin of the Ultimobranchial Body and Its Colonizing Cells in Human Embryos. *Cells Tissues Organs* 1989;136(4):325–330; doi: 10.1159/000146846.

Page C, Cuvelier P, Biet A, et al. Thyroid Tubercle of Zuckerkandl: Anatomical and Surgical Experience from 79 Thyroidectomies. *J Laryngol Otol* 2009;123(7):768–771; doi: 10.1017/S0022215108004003.

Pelizzo MR, Toniato A and Gemo G. Zuckerkandl's Tuberculum: An Arrow Pointing to the Recurrent Laryngeal Nerve (Constant Anatomical Landmark). *Journal of the American College of Surgeons* 1998;187(3):333; doi: 10.1016/S1072-7515(98)00160-4.

Rajapaksha A, Fernando R, Ranasinghe N, et al. Morphology of the Tubercle of Zuckerkandl and Its Importance in Thyroid Surgery. *Ceylon Medical Journal* 2015;60(1); doi: 10.4038/cmj.v60i1.7141.

Sharp E, Roberts M, Żurada-Zielińska A, et al. The Most Commonly Injured Nerves at Surgery: A Comprehensive Review. *Clinical Anatomy* 2021;34(2):244–262; doi: 10.1002/ca.23696.

Sheahan P and Murphy MS. Thyroid Tubercle of Zuckerkandl: Importance in Thyroid Surgery. *The Laryngoscope* 2011;121(11):2335–2337; doi: 10.1002/lary.22188.

Viveka S. Review of Surgical Anatomy of Tubercle of Zuckerkandl and Its Importance in Thyroid Surgery. *CHRISMED Journal of Health and Research* 2018;5(2):91; doi: 10.4103/cjhr.cjhr_107_17.

Won H-J, Won H-S, Kwak D-S, et al. Zuckerkandl Tubercle of the Thyroid Gland: Correlations between Findings of Anatomic Dissections and CT Imaging. *American Journal of Neuroradiology* 2017;38(7):1416–1420; doi: 10.3174/ajnr.A5172.

Yalcin B, Tagil SM, Kocabiyik N, et al. Incidence and Morphology of the Zuckerkandl's Tubercle: An Anatomic Dissection Study. 2009. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Incidence-and-morphology-of-the-zuckerkandl%27s-An-Yalcin-Tagil/7c014ocf2176a41e1e6e6b573d2a10c51e87043c> [Last accessed: 2/5/2025].

Význam genetického testovania v diagnostike von Willebrandovej choroby – kazuistiky

Žolková, J.¹, Lisá, L.¹, Kolková, Z.², Loderer, D.², Provazníková, D.³, Hrachovinová, I.³,
Lasabová, Z.⁴, Staško, J.¹, Sokol, J.¹, Pěč, M.^{5*}, Franecková, M.⁵

¹ Klinika hematológie a transfuziológie, Národné centrum hemostázy a trombózy, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Martin

² Martinské centrum pre biomedicínu BioMed, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

³ Laboratoř pro poruchy hemostázy, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

⁴ Ústav molekulovej biológie a genomiky, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

⁵ Ústav lekárskej biológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

* korešpondenčný autor
prof. MUDr. Martin Pěč, PhD., MPH
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Univerzita Komenského v Bratislave

Ústav lekárskej biológie

Malá Hora 4
036 01 Martin

tel: +421 43 2633 440 e-mail: martin.pec@uniba.sk

Abstrakt

Sekvenovanie génu pre von Willebrandov faktor (vWF) prinieslo nový pohľad na fyziológiu vWF ako aj na jeho patofyziológiu v kontexte von Willebrandovej choroby (vWCH). Za 30 rokov odkedy bola popísaná sekvencia VWF génu bolo identifikovaných takmer 600 mutácií a množstvo patomechanizmov, ktoré prispievajú k vzniku vWCH. Identifikácia mutácií, u pacientov s vWCH pomáha pochopiť príčinu redukovanej plazmatickej koncentrácie alebo nesprávnej funkčnej aktivity vWF a vysvetliť vzťah medzi identifikovaným genotypom pacienta s vWCH a jeho fenotypom, klinickými prejavmi ochorenia v zmysle výskytu krvácajúcich prejavov a ovplyvnenia jednotlivých laboratórnych parametrov.

Kľúčové slová: von Willebrandova choroba, von Willebrandov faktor, genetické testovanie, mutácia

Úvod

von Willebrandova choroba (vWCH) predstavuje najčastejšie vrodené krvácavé ochorenie. Na základe literárnych zdrojov je odhadovaná prevalencia tohto ochorenia v populácii asi 1 %. Avšak realistickejšia prevalencia, založená na počte symptomatických pacientov v medicínskych zariadeniach sa pohybuje okolo 0,05 % (Favaloro et al., 2016). Prevalencia pacientov s vWCH založená na počte symptomatických pacientov sledovaných v špecializovaných centrách v Slovenskej republike je udávaná ako 11,2 pacientov na 100 000 obyvateľov. V roku 2017 bolo v Národnom registri vrodených krvácavých ochorení na Slovensku zaevidovaných 610 pacientov s diagnózou vWCH (Kubisz et al., 2018).

Príčinou vzniku vWCH je vrodený defekt koncentrácie, štruktúry alebo funkcie vWF. Celkový deficit a funkčné poruchy môžu byť spôsobené zníženou/chybnou syntézou alebo zrýchleným odbúraním vWF v krvnom riečišti. Dôsledkom tohto defektu je nedostatočná tvorba primárnej trombocytárnej zátky, a taktiež sa znižuje plazmatická koncentrácia koagulačného faktora FVIII, pretože nie je chránený pred degradáciou proteázami (Penka, 2011). vWF je náchylný na kvantitatívne a heterogénne štrukturálne a funkčné poruchy. V súčasnosti platná klasifikácia navrhnutá subkomisiou pre vWCH Medzinárodnej spoločnosti pre trombózu a hemostázu (International Society on Thrombosis and Hemostasis) založená na hodnotení prítomnosti vWF v plazme rozdeľuje vWCH na 6 typov 1, 2A, 2B, 2N, 2M, 3. Typy 1 a 3 sú kvantitatívne deficity a typ 2 so štyrmi podtypmi predstavujú kvalitatívne defekty vWF (Smejkal, 2008; Kubisz a kol. 2006).

Veľkú variabilitu môžeme pozorovať aj vo forme a intenzite krvácavých prejavov, laboratórnom náleze a v genotype pacientov s vWCH. Miera a intenzita krvácavých prejavov u pacientov s vWCH závisí od stupňa poškodenia vWF, od typu a závažnosti defektu. vWCH je typická prítomnosťou krvácania zo slizníc, nosa, menorágiou či nadmerným krvácaním po pôrode. Menej často sa vyskytuje krvácanie z tráviaceho traktu a u ťažších defektov, kedy je sekundárne znížená aj plazmatická koncentrácia FVIII, sú prítomné svalové hematómy či hemartros (Staško et al., 2016). Diagnózu a klasifikáciu tohto ochorenia nie je možné stanoviť na základe jedného diagnostického testu. Je potrebné realizovať panel skriningových, špecifických a diskriminačných testov, ktorých cieľom je odlíšiť kvalitatívny a kvantitatívny defekt vWF a spoľahlivo určiť podtyp vWCH. Určenie správnej diagnózy a typu vWCH je kľúčové a ovplyvní celý ďalší manažment pacienta.

vWCH je vo väčšine prípadov spôsobená mutáciami v géne pre vWF, ktorý sa nachádza na krátkom ramienku chromozómu 12 v pozícii 12p13.31 s celkovou dĺžkou 178 kb. Identifikácia mutácií v géne pre vWF u pacientov s vWCH pomáha pochopiť príčinu redukovanej plazmatickej koncentrácie alebo nesprávnej funkčnej aktivity vWF. Genetické testovanie pacientov s vrodenými krvácavými poruchami hemostázy na Slovensku nie je rutinnou súčasťou diagnostického procesu,

napriek tomu môže poskytnúť špecifickejšiu diagnózu. Jeho 52 exónov kóduje proteín zložený z 2813 aminokyselín (James PD, Goodeve AC, 2011). Produkt génu VWF pozostáva z presne usporiadaných opakujúcich sa domén. Domény sú uložené v poradí D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK. V týchto doménach sú lokalizované väzobné miesta pre jednotlivé ligandy a sú zodpovedné za funkcie vWF (obr. 1).

Okrem toho bol u ľudí na chromozóme 22 lokalizovaný aj parciálny pseudogén VWF génu, ktorý predstavuje jeho nefunkčnú duplikáciu v rozpätí exónov 23 až 34. Sekvencia pseudogénu vykazuje 97 % podobnosť so sekvenciou autentického VWF génu (Baronciani et al., 2017).

Za viac ako 35 rokov, odkedy bol popísaný VWF gén, boli v jeho sekvencii objavené a popísané stovky mutácií. V databáze medzinárodnej spoločnosti pre trombózu a hemostázu (Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis ISTH-SSC vWF Online Database) bolo doteraz zaevidovaných 589 mutácií v géne pre vWF, hoci je známe, že nie všetky publikované mutácie sú v tejto databáze zahrnuté. Väčšina identifikovaných mutácií sú missense mutácie, malé delécie/inzercie, zostrihové a nonsense mutácie v kódujúcej oblasti, promotore a miestach zostrihu (Zolkova et al., 2020).

Význam genetického testovania pri vWCH

V posledných rokoch bol význam genetického testovania často diskutovaný. Aký je význam genetického testovania v rutinej diagnostike? Je genetické testovanie benefitom u všetkých pacientov s vWCH? Vo všeobecnosti prevláda názor, že ak sú dostupné všetky laboratórne testy, genetické testovanie na skríning mutácií môže len potvrdiť fenotyp pacienta. Na druhej strane, ak niektoré z týchto fenotypových vyšetrení nie je dostupné, potom identifikácia kauzálnej mutácie môže byť pre stanovenie pacientovej diagnózy kľúčová (Baronciani et al., 2017). Genetické testovanie pri vWCH má najväčší význam pre potvrdenie typu 2 vWCH. Väčšina mutácií pri type 2 vWCH je lokalizovaných v exónoch 18 až 24 (typ 2N) a v exóne 28 (typ 2A, 2B, 2M), čo v týchto prípadoch umožňuje priamu analýzu DNA. V prípade znížených hladín FVIII, najmä u mužov, je potrebné odlíšiť hemofíliu A od typu 2N vWCH. Identifikácia, ktorá porucha je prítomná, a teda typ dedičnosti je nevyhnutný pri predpovedaní rizika krvácania u členov rodiny a môže ovplyvniť výber liečby. Genetická analýza exónov kódujúcich domény D' - D3 VWF a génu F8 v prípade potreby môže identifikovať mutáciu (mutácie) a umožniť diferenciálnu diagnostiku. Pri type 3 vWCH môže byť prenatálna, prípadne postnatálna genetická analýza užitočná pri posudzovaní rizika ovplyvnenia budúcich potomkov (Baronciani et al., 2017). Genetické testovanie sa pri type 1 vWCH robí menej často, pretože vyžaduje sekvenáciu celého VWF génu a k odhaleniu kauzálnej mutácie dochádza len v menšom počte prípadov. Podľa výsledkov multicentrických štúdií, až u 35 % pacientov s typom 1 vWCH nebola identifikovaná žiadna kauzálna mutácia v géne pre vWF. Sú to zvyčajne prípady s miernou formou vWCH.

Pacienti a metódy

Do štúdie, ktorej cieľom bolo sledovanie vzťahu medzi laboratórnym fenotypom a genotypom u pacientov s vWCH boli zaradení pacienti s laboratórne potvrdenou diagnózou vWCH. U všetkých pacientov boli v Národnom centre hemostázy a trombózy (NCHaT) na Klinike hematológie a transfuziológie JLF UK a UNM realizované vyšetrenia základnej a špeciálnej hemostázy na skríning vWCH. Zaradeným pacientom bola realizovaná sekvenácia génu VWF na princípe sekvenovania novej generácie. Prostredníctvom aplikácie DesignStudio™ (Illumina, USA) bol nadizajnovaný vlastný návrh panelu pre sekvenovanie DNA využívajúci amplikónovú technológiu (AmpliSeq for Illumina). Panel bol nadizajnovaný tak, aby pokrýval sekvenciu všetkých 52 exónov, intrónovú sekvenciu o dĺžke 25 bp po oboch stranách každého exónu, a taktiež aj 5' a 3' neprekladané oblasti (UTR) VWF génu. Sekvenácia vzoriek prebiehala na prístroji MiSeq (Illumina, USA). Varianty identifikované pomocou NGS analýzy sme verifikovali pomocou Sangerovej metódy sekvenovania. U pacientov, kde sme pomocou NGS sekvenovania neidentifikovali kauzálnu mutáciu sme realizovali MLPA analýzu použitím komerčného kitu SALSA MLPA probemix P011-P012 VWF (MRC Holland, Holandsko). Genetické testovanie pacientov bolo realizované v Martinskom centre pre biomedicínu BioMed, Martin a na Ústave molekulovej biológie a genomiky JLF UK. MLPA analýza bola vykonaná v Ústave hematologie a krevní transfuze v Prahe.

Výsledky – kazuistiky

Kazuistika č.1:

Prvou pacientkou je žena narodená v roku 1986 odoslaná do NCHaT spádovým hematológom pre diferenciálnu diagnostiku zníženej funkčnej aktivity FVIII (FVIII:C 0,157 IU/ml N: 0,60-1,50 IU/ml). V osobnej anamnéze pacientka nepopisovala žiadne krvácavé prejavy, taktiež rodinná anamnéza bola na výskyt krvácajúcich prejavov negatívna. V čase realizácie laboratórných vyšetrení bola pacientka v 12. týždni gravidity. V laboratórnom náleze (tab. 1) mala zníženú funkčnú aktivitu FVIII, no funkčná aktivita aj hladina antigénu vWF bola v norme. Takýto laboratórny nález by mohol svedčiť pre typ 2N vWCH, ale aj pre miernu formu Hemofílie A. Cieľom genetického testovania teda bolo sekvenovanie génu VWF na potvrdenie typu 2N vWCH. Zároveň bola pacientka odoslaná do genetickej ambulancie za účelom vylúčenia prenášačstva Hemofílie A. Genetickou analýzou sme u pacientky vo VWF gène identifikovali missense mutáciu p.Arg854Gln v homozygotnom stave, čo podporuje diagnózu typu 2N vWCH.

Odlíšenie fenotypovo podobných ochorení, ako je typ 2N vWCH a Hemofília A je často možné až na základe genetického testovania. Identifikácia, ktorá porucha je prítomná, a teda typ dedičnosti je nevyhnutný pri predpovedaní rizika krvácania u členov rodiny a môže ovplyvniť výber

liečby. Pacienti odoslaní na genetickú analýzu 2N vWCH majú často len malú alebo žiadnu rodinnú anamnézu krvácania alebo históriu, ktorá nie je jednoznačne v súlade s dedičnosťou X-viazanej recesívnej hemofilie A alebo autozomálnej recesívnej 2N vWCH. Genetická analýza exónov kódujúcich domény D'-D₃ VWF a F8 v prípade potreby môže identifikovať mutáciu (mutácie) a umožniť diferenciálnu diagnostiku (Swystun LL, James PD, 2017).

Kazuistika č.2:

Druhá kazuistika porovnáva dvoch pacientov. Pacient 2 je muž narodený v roku 1982, ktorý je dlhodobo sledovaný v ambulancii NCHaT pre výrazné krvácavé prejavy – časté epistaxy, gingivorágie a krvácania do laktových a členkových kĺbov, ktoré viedli k obmedzeniu flexie, extenzie a rotácie. Pacient 3 je muž narodený v roku 1969, taktiež dlhodobo sledovaný v ambulancii NCHaT pre výrazné krvácania do kĺbov lakťa a členka s obmedzením hybnosti. Tabuľka č.2 zobrazuje porovnanie laboratórnych nálezov týchto pacientov. U obidvoch pacientov sú prítomné takmer nedetekovateľné koncentrácie a hodnoty funkčnej aktivity vWF a s tým súvisiace predĺženie časov zrážania a ďalších laboratórnych parametrov. Takýto laboratórny nález je typický pre pacientov s typom 3 vWCH, no aj pre ťažkú formu typu 1 vWCH. Odlíšenie týchto dvoch podtypov je možné na základe genetického testovania. U pacienta 2 sme v géne VWF identifikovali dva kauzálne varianty – heterozygotnú deléciu C v exóne 18 (c.2435 delC) a heterozygotnú deléciu exónov 1-3 VWF génu, čo svedčí pre typ 3 vWCH, ktorý je typický autozomálne recesívnou dedičnosťou. V prípade pacienta 3 sme ako jediný kauzálny variant identifikovali heterozygotnú deléciu C v exóne 18 (c.2435 delC), čo svedčí pre typ 1 vWCH, ktorý je typický autozomálne dominantnou dedičnosťou.

Odlíšenie typu 3 vWCH od ťažkej formy typu 1 vWCH je potrebné z hľadiska odlišných liečebných možností týchto pacientov. Kým pacientom s typom 3 vWCH je indikovaná profylaktická liečba koncentrátmi vWF/FVIII, pacienti s typom 1 vWCH sú často liečení v režime on demand (Federici AB, James P., 2012). Literatúra uvádza, že v súvislosti s niektorými deléciami bol v zriedkavých prípadoch (7,5-9,5 % pacientov) zaznamenaný rozvoj aloprotilátok proti vWF u pacientov s typom 3 vWCH liečených koncentrátmi vWF. Genetické testovanie týchto pacientov môže teda pomôcť aj v hodnotení rizika rozvoja aloprotilátok (Bowman et al., 2013).

Kazuistika č.3:

Tretia kazuistika predstavuje ženu narodenú v roku 1991, sledovanú v NCHaT pre zvýšenú tvorbu modrín, gingivorágiu a menorágiu vyžadujúcu substitúcie železa. Tabuľka 3 zobrazuje laboratórny nález tejto pacientky. Na základe skríningových testov (vWF:Ag, vWF:Ac, FVIII:V) by bola pacientka klasifikovaná ako typ 1 vWCH. Hodnoty vWF:Ag a vWF:Ac sú proporcionálne znížené a pomer vWF:Ac/vWF:Ag je vyšší ako 0,6 čo svedčí pre kvantitatívny defekt vWF. Avšak analýza multimérov prekvapivo odhalila deficit multimérov s veľkou aj strednou molekulárnou hmotnosťou.

Abnormálny vzor multimérov je typický pre kvantitatívne podtypy vWCH, ako napríklad typ 2A vWCH. Genetickým testovaním sme u tejto pacientky odhalili mutáciu p.Trp1144Gly.

Táto mutácia je príčinou zmiešaného fenotypu, ktorý sa laboratórne prejavuje ako dominantný typ 1 vWCH s abnormálnymi multimérmami s typickými znakmi podtypu 2A/IIE. Skupina pacientov s podobnými mutáciami bola označená ako typ 1/2E. Hlavnou príčinou zvýšeného deficitu vWF u pacientov s typom 1/2E vWCH je zvýšený klírens vWF z cirkulácie, pre ktorý svedčí signifikantne zvýšený pomer vWF:pp/vWF:Ag (Gadisseeur et al., 2009). Genetické testovanie má význam aj v prípade nejasných nálezov, kedy je na základe fenotypových vyšetrení obtiažne identifikovať podtyp vWCH.

Diskusia a záver

V rutinnej diagnostike vo väčšine prípadov kompletná laboratórna diagnostika umožňuje stanoviť diagnózu pacienta. No aj na základe našich skúseností je možné demonštrovať, že existujú špeciálne situácie, kedy genetické testovanie môže byť nápomocné, dokonca v niektorých prípadoch kľúčové. Potrebný je individuálny prístup, založený na interakcii medzi lekárom, pacientom a skúseným laboratóriom, aby sa predišlo chybnjej klasifikácii vWCH. Pri stanovovaní diagnózy je potrebné brať do úvahy aj environmentálne faktory, ktoré vplývajú na plazmatické koncentrácie vWF. Podobné štúdie na veľkej populácii pacientov s vWCH, ktoré popisujú vzťahy medzi genotypom a fenotypom na veľkom počte pacientov, poskytujú komplexné a unikátne dáta.

Použitá literatúra

- Baronciani L. – Goodeve A. – Peyvandi F. Molecular diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia*. 2017; Mar;23(2):188-197.
- Bowman M, Tutley A, Notley C, et al; Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. The genetics of Canadian type 3 von Willebrand disease: further evidence for co-dominant inheritance of mutant alleles. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(03):512–520.
- Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J. Laboratory tests used to help diagnose von Willebrand disease: an update. *Pathology*. 2016 Jun;48(4):303-18.
- Federici AB, James P. Current management of patients with severe von Willebrand disease type 3: a 2012 update. *Acta Haematol*. 2012;128(2):88-99.
- Gadisseeur A, Berneman Z, Schroyens W, et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease type 1/2E (2A subtype IIE), type 1 Vicenza and mild type 1 caused by mutations in the D3, D4, B1-B3 and C1-C2 domains of the von Willebrand factor gene. Role of von Willebrand factor multimers and the von Willebrand factor propeptide/antigen ratio. *Acta Haematol*. 2009; 121(2-3):128-38.
- James PD, Goodeve AC. Von Willebrand disease. *Genet Med*. 2011 May;13(5):365-76.

Kubisz P, Sokol J, Simurda T, et al. Diagnosis and management of von Willebrand disease in Slovakia. Ann Blood. 2018;3:9.

Staško J, Sokol J, Dobrotová M, et al. Von Willebrandova choroba – profylaxia a liečba. Vaskulárna medicína. 2016;8(3) pp. 116-121.

Swystun LL, James PD. Genetic diagnosis in hemophilia and von Willebrand disease. Blood Rev. 2017 Jan;31(1):47-56.

Zolkova J, Sokol J, Simurda T. Genetic Background of von Willebrand Disease: History, Current State, and Future Perspectives. Semin Thromb Hemost. 2020 Jun;46(4):484-500.

Prílohy

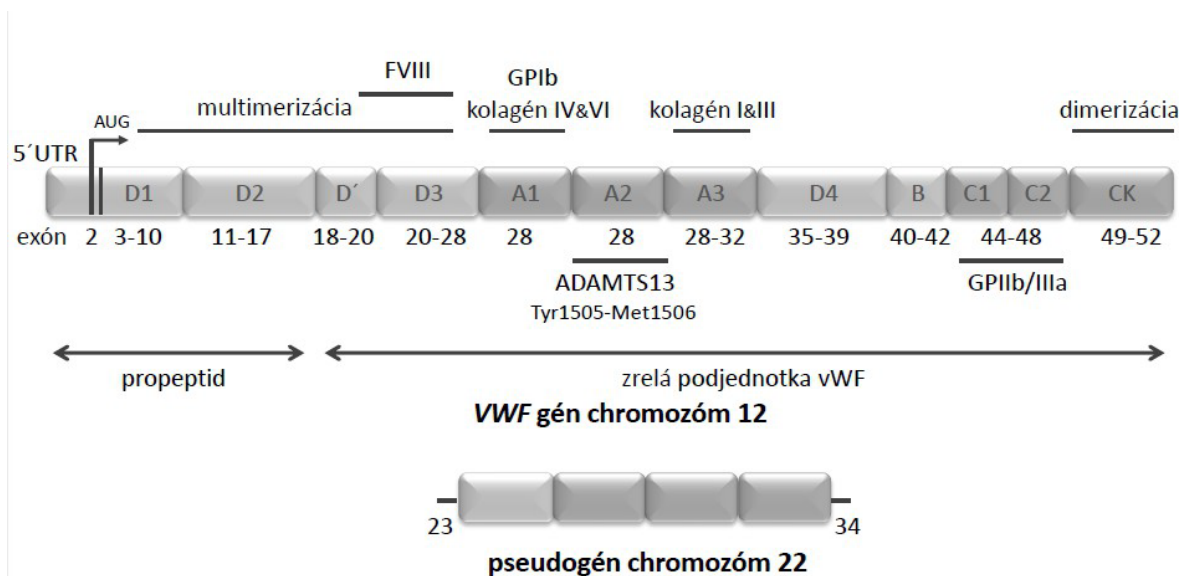
Tabuľka č.1.: Laboratórny nález pacientky č.1.

Parameter + referenčná hodnota	Výsledok pacientky 1
APTT (25-36 s)	34,8
vWF:Ac (0,50-1,40 IU/ml)	0,75
vWF:Ag (0,60-1,50 IU/ml)	0,70
FVIII:C (0,60-1,50 IU/ml)	0,285
PFA COL/ADP (62-100 s)	139
PFA COL/EPI (82-150 s)	119
FVIII:INH (> BU)	0,00
vWF:FVIII B (20-100 %)	24,60
vWF:CBP (50-160 %)	138,7
LMW multiméry (12-15 %)	17
IMW multiméry (22-35 %)	28
HMW multiméry (47-70%)	49

Vysvetlivky: APTT – aktivovaný parciálny tromboplastikový čas; vWF:Ac – funkčná aktivita vWF; vWF:Ag – koncentrácia antigénu vWF; FVIII:C – funkčná aktivita FVIII, PFA COL/ADP – stanovenie funkcie trombocytov s použitím cartridge s kolagénom a ADP; PFA COL/EPI - stanovenie funkcie trombocytov s použitím cartridge s kolagénom a epinefrínom; FVIII:INH – titer inhibítora voči FVIII; vWF:FVIII B – väzobná kapacita vWF na FVIII; vWF:CBP - väzobná kapacita vWF na kolagén; LMW multiméry – multiméry vWF s nízkou molekulovou hmotnosťou; IMW multiméry - multiméry vWF so

strednou molekulovou hmotnosťou; HMW multiméry - multiméry vWF s vysokou molekulovou hmotnosťou

Obrázok 1. Štruktúra prekursora faktora von Willebranda (VWF), jeho gén a pseudogén.



Tabuľka č.2.: Porovnanie laboratórnych nálezov pacientov 2 a 3

Parameter + referenčná hodnota	Výsledky pacienta 2	Výsledky pacienta 3
APTT (25-36 s)	39,8	51,7
vWF:Ac (0,50-1,40 IU/ml)	0,01	0,01
vWF:Ag (0,60-1,50 IU/ml)	0,01	0,01
FVIII:C (0,60-1,50 IU/ml)	0,052	0,052
PFA COL/ADP (62-100 s)	>300	>300
PFA COL/EPI (82-150 s)	>300	>300
vWF:CBP (50-160 %)	0,159	0,12
Čas krvácania – Duke (2-5 min)	>10	>10

Tabuľka č.3.: Laboratórny nález pacientky č.4.

Parameter + referenčná hodnota	Výsledok pacientky 4
APTT (25-36 s)	39,7
vWF:Ac (0,50-1,40 IU/ml)	0,16
vWF:Ag (0,60-1,50 IU/ml)	0,13
FVIII:C (0,60-1,50 IU/ml)	0,342

PFA COL/ADP (62-100 s)	>300
PFA COL/EPI (82-150 s)	236
LMW multiméry (12-15 %)	17
IMW multiméry (22-35 %)	18
HMW multiméry (47-70%)	37
Čas krvácania – Duke (2-5 min)	4,5

Zmeny mikrocirkulácie v psoriatických léziách

Kunertová L.

Ústav anatómie, Jesseniová lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Abstrakt

Naša publikácia prináša informácie o mikrocirkulácii, o jej vývoji a zmenách v zdravej ale aj patologicky zmenenej koži, o expresii hlavných rastových faktorov stimulujúcich angiogenézu a lymfangiogenézu. Vedomosti o úlohe mikrocirkulácie, angiogenézy a lymfangiogenézy v chronickom zápale a iných patologických léziách a ich ovplyvnenie nám ponúkajú možnosti nového terapeutického smerovania.

Úvod

Psoriáza je primárne zápalové ochorenie kože s akútno – exantematickým alebo chronicko – stacionárnym priebehom na základe genetickej predispozície. Etiopatogenéza tohto ochorenia je multifaktoriálna a nie je celkom jasná. Vo veľkej miere ku vzniku a rozvoju prispievajú genetické predispozície spojené s rôznymi endogénnymi a exogénnymi faktormi (Buchvald et al., 1992, Braun-Falco et al., 2001) Pri tomto ochorení dochádza k významným zmenám v mikrovaskulatúre. Mikrovaskulárne zmeny sa vyskytujú už v skorých fázach vývoja psoriatických lézií (Creamer et al., 2002) a sú prítomné iba na cievach povrchovej spleti – plexus subpapillaris (Creamer, 1997). Kapilárne zmeny samotné síce nie sú príčinou vývoja psoriatických lézií, ale výrazne ovplyvňujú klinické prejavy ochorenia a pretrvávajú psoriatických lézií (Hern et al., 2001). Proliferáciu plexus subpapillaris v psoriatických léziách opakovane potvrdili viaceré štúdie (Braverman, 1972; Braverman et Yen, 1974, 1977a, 1977b; Barton et al., 1992; Creamer et al., 1997; 2002). V psoriatických léziách dochádza k nadmernej angiogenéze a lymfangiogenéze. Tieto novovytvorené cievy sú dilatované, predĺžené a majú kľukaté alebo špirálovité usporiadanie v pars papillaris dermis. Typickým znakom je zvýšená permeabilita ciev. Taktiež endotelové bunky vykazujú zvýšenú permeabilitu, čo vedie k úniku plazmatických proteínov do tkaniva a vzniku edému. Dochádza k stratifikácii endotelových buniek a hyperplázii pericytov, čo podporuje vaskulárnu remodeláciu.

Podoplanín (PDPN) je glykoproteín exprimovaný na povrchu lymfatických endotelových buniek, fibroblastov a niektorých imunitných buniek. Zohráva dôležitú úlohu v lymfangiogenéze. V kontexte psoriázy sa skúma jeho úloha pri regulácii lymfatického systému, aktivácii imunitnej odpovede a rozvoji chronického zápalu. Štúdie (Asai, 2022, Quintanilla et al., 2019) preukázali, že hladina

podoplanínu je výrazne zvýšená v kožných léziách pacientov so psoriázou. Táto expresia je výrazná v lymfatických endotelových bunkách. Keďže PDPN je marker tvorby lymfatických ciev, jeho zvýšená expresia naznačuje zvýšenú lymfangiogenézu. Tiež vo fibroblastoch bola dokázaná zvýšená expresia PDPN, čo môže podporovať fibrotizáciu kože a interakcie s imunitným systémom. Podoplanín zohráva úlohu pri migrácii a aktivácii imunitných buniek v psoriatických plakoch. Je spojený s aktiváciou prozápalových dráh, čo vedie k perzistencii psoriatických plakov. PDPN podporuje lymfangiogenézu, ale lymfatické cievy v psoriatických ložiskách sú často dysfunkčné, čo vedie k nedostatočnému odtoku zápalových mediátorov. Stimuluje migráciu dendritických buniek a T-lymfocytov, čím zosilňuje autoimunitnú odpoveď

Vaskulárny endoteliálny rastový faktor C (VEGF-C) je kľúčový proteín regulujúci lymfangiogenézu. V posledných rokoch sa zistilo, že VEGF-C zohráva dôležitú úlohu v patogenéze psoriázy. Štúdie preukázali, že hladiny VEGF-C sú výrazne zvýšené v koži pacientov. VEGF-C je produkovaný keratinocytmí, makrofágmi a T-lymfocytmí v psoriatických ložiskách, čo naznačuje jeho úlohu v udržiavaní chronického zápalu. Jeho zvýšená aktivita vedie k hyperplázii a dilatácii lymfatických ciev, čo môže ovplyvniť lymfatický odtok a hromadenie zápalových buniek.

Vaskulárny endoteliálny rastový faktor receptor 3 (VEGFR-3) je dôležitý receptor, ktorý sprostredkováva lymfangiogenézu. Aktivuje sa najmä väzbou na VEGF-C a VEGF-D a je kľúčový pre správnu funkciu lymfatického systému. V posledných rokoch sa VEGFR-3 dostáva do popredia v súvislosti s patogenézou psoriázy, najmä pre svoju úlohu v zápalových procesoch a lymfatickej dysfunkcii. VEGFR-3 je výrazne zvýšený v endoteliálnych bunkách lymfatických ciev v psoriatickej lézii. Chronický zápal vedie k hyperplázii a dysfunkcii lymfatických ciev, čo spôsobuje hromadenie zápalových buniek a mediátorov v koži. Je nadmerne aktivovaný v dôsledku zvýšených hladín jeho ligandov (VEGF-C a VEGF-D) produkovaných keratinocytmí, makrofágmi a T-lymfocytmí v psoriatických ložiskách.

Záver

Ukazuje sa ako dôležitý faktor v patogenéze psoriázy, najmä v súvislosti s lymfangiogenézou, aktiváciou fibroblastov a reguláciou zápalu. Jeho zvýšená expresia v psoriatických léziách naznačuje, že by mohol byť novým biomarkerom alebo terapeutickým cieľom pri vývoji nových liečebných stratégií. Výskum v tejto oblasti pokračuje a môže priniesť nové možnosti liečby pre pacientov so psoriázou. VEGF-C je ďalší kľúčový faktor v patogenéze psoriázy, ktorý ovplyvňuje lymfangiogenézu, imunitnú odpoveď a chronický zápal. Hoci jeho presná úloha ešte nie je úplne objasnená. VEGFR-3 hrá taktiež kľúčovú úlohu v patogenéze psoriázy, najmä prostredníctvom lymfangiogenézy a regulácie zápalovej odpovede. Hoci presná úloha VEGFR-3 v psoriáze ešte nie je úplne objasnená, podobne ako VEGF-C, ich modulácia signalizácie predstavuje potenciálny nový terapeutický prístup, ktorý by mohol zlepšiť zápalovú kontrolu a funkciu lymfatických ciev v psoriatickej koži. Z uvedeného vyplýva, že podrobné poznanie zmien mikrocirkulácie a faktorov, ktoré ju ovplyvňujú, môže zásadným spôsobom ovplyvniť rozvoj, priebeh ochorenia ale hlavne jeho terapiu.

Použitá literatúra

- Asai J. The Role of Podoplanin in Skin Diseases, nt. J. Mol. Sci. 2022, 23(3), 1310;
<https://doi.org/10.3390/ijms23031310>
- Barton, S.P., Abdullah, M.S., et Marks, R. Quantification of microvascular changes in the skin in patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology* 126, 1992, 569 – 74
- Braverman, I.M. Electron microscopic studies of the microcirculation in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 59, 1992, 91-98.
- Braverman, I.M. Ultrastructure and organisation of the cutaneous microvasculature in normal and pathological stages. *Journal of Investigative Dermatology* 93, 1986, 2S-9S.
- Braverman, I.M. The cutaneous microcirculation. *Journal of Investigative Dermatology Symp. Proc.* 5, 2000, 3-9.
- Braverman, I.M. et Sibley, J. Role of microcirculation in the treatment and pathogenesis of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 1982, 78, 12–17.
- BRAVERMAN, I.M. et SIBLEY, J. Ultrastructural and 3-dimensional analysis of the contractile cells of the cutaneous microvasculature. *Journal of Investigative Dermatology* 95, 1990, 90-96.
- Braverman, I.M. et YEN, A. Microcirculation in psoriatic skin. *Journal of Investigative Dermatology* 62, 1974, 493-502.
- Braverman, I.M. et YEN, A. Ultrastructure of the human dermal microcirculation II. The capillary loops of the dermal papillae. *Journal of Investigative Dermatology* 68, 1977, 44–52.
- Braverman, I.M. et YEN, A. Ultrastructure of the capillary loops in the dermal papillae of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 68, 1977, 53-60.

- Braverman, I.M. et YEN, A. Valve-containing collecting veins at the dermal-subcutaneous junction, *Journal of Investigative Dermatology* 81,1983, 43 - 8.
- Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., *Dermatológia a venerológia*, Martin, Vydavateľstvo Osveta,2001, ISBN 80-8063-080-1
- Buchvald J., et al., *Dermatovenerológia*. Martin, Osveta, 1993, s. 101-106
- Bull, R.H., Bates, D.O. et Mortimer, P.S. Intravital video-capillaroscopy for the study of the microcirculation in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 126, 1992, 436-45.
- Creamer D., Allen M., Jagga R. R., et al. Mediation of systemic vascular hyperpermeability in severe psoriasis by circulating vascular endothelial growth factor. *Archivers of Dermatology* 138,1992, 791–796
- Creamer D., Allen M.H., Sousa A., et al. Localisation of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *British Journal of Dermatology* 136, 1997, 859 – 865
- Hern, S., Allen, M.H., Sousa A.R. et al. Immunohistochemical evaluation of psoriatic plaques following selective photothermolysis of the superficial capillaries *British Journal of Dermatology* 145, 2001, 45-53.
- Quintanilla M. et al. Podoplanin in Inflammation and Cancer, *nt. J. Mol. Sci.* 2019, 20(3), 707; <https://doi.org/10.3390/ijms20030707>